

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**NANOEMULSÕES DE ÓLEO DE COPAÍBA (*Copaifera multijuga* HAYNE):
DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO, ESTUDO DE PERMEACÃO
CUTÂNEA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E
LEISHMANICIDA TÓPICAS.**

LETICIA GROLI LUCCA

PORTO ALEGRE, 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Nanoemulsões de óleo de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne): desenvolvimento tecnológico, estudo de permeação cutânea e avaliação das atividades anti-inflamatória e leishmanicida tópicas.

Tese apresentada por **Leticia Grolli Lucca**
para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em
Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Letícia Scherer Koester

Porto Alegre, 2017

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 22.09.2017, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa Dr Karina Paese

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Profa Dr Nadia Maria Volpato

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof Dr Pedro Roosevelt Torres Romão

Universidade Federal de Ciências Básicas da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

Lucca, Leticia Grolli

Nanoemulsões de óleo de copaíba (Copaifera multijuga Hayne): desenvolvimento tecnológico, estudo de permeação cutânea e avaliação das atividades anti-inflamatória e leishmanicida tópicas. / Leticia Grolli Lucca. -- 2017.

223 f.

Orientadora: Leticia Scherer Koester.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Óleo de copaíba. 2. Nanoemulsão. 3. Via cutânea. 4. Anti-inflamatório. 5. Leishmaniose. I. Koester, Leticia Scherer, orient. II. Título.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Desenvolvimento Galênico, Laboratório de Toxicologia, Central Analítica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Laboratoire Chimiothérapie Antiparasitaire da Faculdade de Farmácia da Université Paris Sud XI com apoio financeiro da CAPES, FAPERGS e CNPq. A autora recebeu bolsa de estudos da CAPES no Brasil e do CNPq na França.

RESUMO

O óleo de copaíba é um produto natural encontrado principalmente na região amazônica, onde é utilizado na medicina popular como tratamento para inflamações e como cicatrizante. A espécie *Copaifera multijuga* Hayne demonstrou um potencial efeito anti-inflamatório em relação a outras espécies de *Copaifera* L., tendo como principal responsável o composto majoritário β -cariofileno. Nosso grupo de pesquisa vem estudando a veiculação deste óleo em nanoemulsões e desenvolveu uma formulação que contém uma elevada proporção de óleo de copaíba no núcleo oleoso (20 % w/v), sem prejuízo da estabilidade do sistema. A partir desta formulação, seguiram-se os estudos de avaliação da permeação cutânea, de otimização da formulação e de avaliação de atividade anti-inflamatória, apresentados neste trabalho. Um método em cromatógrafo a gás acoplado à espectrômetro de massas no modo *headspace* (HS-CG/EM) foi validado a fim de analisar β -cariofileno em mostras de pele provenientes do teste de permeação cutânea com nanoemulsões de óleo de copaíba. O método mostrou-se específico, linear, preciso e exato. O teste de permeação cutânea demonstrou que apenas com a nanoemulsão é possível detectar β -cariofileno na camada da derme, enquanto que, com o óleo, somente no estrato córneo. A seguir, foram testados dois tensoativos catiônicos na formulação da nanoemulsão para verificar se a carga positiva na interface da gotícula poderia promover a permeação cutânea do β -cariofileno. O tensoativo brometo de cetiltrimetilamônio provou ser mais eficiente em concentrações consideradas seguras para o uso tópico, revertendo o potencial zeta para valores adequados, sem interferir no tamanho de gotícula e índice de polidispersão. O tensoativo oleilamina também reverteu o potencial zeta, porém somente em concentrações muito elevadas, podendo ser consideradas tóxicas. O teste de permeação cutânea demonstrou que a incorporação de tensoativos catiônicos aumenta a retenção de β -cariofileno na epiderme em três vezes, enquanto que, na derme, não há diferença estatística entre as formulações aniônica e catiônica. Após, as nanoemulsões escolhidas foram incorporadas em hidrogéis de Carbopol®, Natrosol® e quitosana com vistas ao espessamento e adequação da viscosidade ao uso tópico. O hidrogel com quitosana

apresentou-se instável, com aumento de tamanho de gotícula e índice de polidispersão, apesar de não ter afetado o potencial zeta. Os hidrogéis de Carbopol® e Natrosol® apresentaram bons resultados de caracterização físico-química, porém somente o hidrogel de Natrosol® foi escolhido para os estudos de permeação cutânea e atividade anti-inflamatória *in vivo*, devido ao seu caráter neutro. No estudo de permeação cutânea das nanoemulsões incorporadas em hidrogel, houve um aumento na retenção de β -cariofileno na derme em relação às nanoemulsões, e houve a facilitação de permeação até o fluido receptor. Por fim, o estudo da atividade *in vivo* das formulações selecionadas demonstrou que o óleo de copaíba apresenta atividade anti-inflamatória e que a sua incorporação em nanoemulsões aumenta este efeito. No entanto, ambas nanoemulsões, tanto negativamente quanto positivamente carregadas, apresentaram resultado semelhante para a inibição do edema. Quando compara-se a permeação cutânea das formulações verifica-se que na derme não há diferença estatística, o que pode justificar a semelhança do grau de inibição da inflamação no teste *in vivo*. Em relação à atividade das nanoemulsões incorporadas em hidrogéis, pode-se verificar que no teste de edema de pata apenas a formulação carregada positivamente teve um efeito mais pronunciado, enquanto no edema de orelha as formulações obtiveram um perfil equivalente ao controle cetoprofeno, porém não potencializaram o efeito do óleo. Quanto ao estudo com os parasitos causadores da Leishmaniose, os testes *in vitro* mostraram que os tratamentos (óleo de copaíba, β -cariofileno e suas nanoemulsões) foram mais eficazes contra as espécies *L. major* e *L. donovani* em comparação às espécies *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. O teste *in vivo* mostrou que todos os tratamentos foram capazes de reduzir a área da ferida dos camundongos infectados com *L. major*. No entanto, eles não conseguiram recuperar totalmente os animais.

Palavras-chave: Óleo de copaíba; nanoemulsão; hidrogel; anti-inflamatório; permeação cutânea; leishmaniose

ABSTRACT

Copaiba oil nanoemulsions: technological development, skin permission study and evaluation of topical anti-inflammatory and leishmanicidal activities.

Copaiba oil is a natural product found especially in the Amazon region, where it is used as treatment for inflammations and as wound healer in the popular medicin. The species *Copaifera multijuga* Hayne showed a potential anti-inflammatory effect in relation to other *Copaifera* L. species, mainly due to its major compound, β -caryophyllene. Our research group studied the oil incorporation in nanoemulsions and developed a formulation containing a high copaiba oil proportion in the oil core (20% w/v) without loss of system stability. Based in this nanoemulsion, we present in this study the skin permeation, the formulation optimization and the anti-inflammatory activity. A method in gas chromatograph coupled with mass spectrometer in headspace mode (HS-GC/MS) was validated to analyze β -caryophyllene in skin samples from the skin permeation assay. The method proved to be specific, linear, precise and accurate. Skin permeation test showed that only with the nanoemulsion is possible to detect β -caryophyllene in the dermis layer, while with the oil, only in the stratum corneum. After, two cationic surfactants were tested in the nanoemulsion to prove if the positive charge on the droplet interface could promote β -caryophyllene permeation. Cetyltrimethylammonium bromide proved to be more effective at concentrations considered safe for topical use, reversing the zeta potential to suitable values, without interfering with droplet size and polydispersity index. Oleylamine also reversed the zeta potential, but only at very high concentrations, that may be considered toxic. Skin permeation test showed that the incorporation of cationic surfactants increases β -caryophyllene retention in the epidermis by three fold, whereas in the dermis, there is no statistical difference between the cationic and anionic nanoemulsions. Afterward, the chosen nanoemulsions were incorporated in Carbopol[®], Natrosol[®] and chitosan hydrogels in order to adjust the viscosity for topical use. Chitosan hydrogel presented instability, with an increase in droplet size and polydispersity index, although it has not affected the zeta potential. Carbopol[®] and Natrosol[®] hydrogels showed good results in physicochemical characterization, but only Natrosol[®] hydrogel was chosen for the following skin permeation

and anti-inflammatory activity *in vivo* studies due to its neutral character. In nanoemulsions thickened-hydrogel skin permeation study, there was an increase in the β -caryophyllene retention in the dermis compared to nanoemulsions, and promoted permeation to the receptor fluid. Finally, *in vivo* anti-inflammatory activity from selected formulations showed that the copaiba oil has anti-inflammatory activity and that its incorporation into nanoemulsions increases this effect. However, both negative and positively charged nanoemulsions, showed similar results for inhibition of edema. When the nanoemulsions' skin permeation is compared, it is found that in the dermis there is no statistical difference, which may explain the similarity degree of inflammation inhibition in the *in vivo* test. Regarding to the activity of the nanoemulsions incorporated in hydrogels, it can be verified that in paw edema assay, only the positively charged formulation had a more pronounced effect, whereas in the ear edema the formulations obtained a profile equivalent to the control, ketoprofen, but did not potentiate the effect of the oil. As for the study with the parasites causing Leishmaniasis, *in vitro* tests showed that the treatments (copaiba oil, β -caryophyllene and their nanoemulsions) were more effective against *L. major* and *L. donovani* compared to *L. amazonensis* and *L. braziliensis*. *In vivo* assay showed that all treatments were able to reduce the wound area of mice infected with *L. major*. However, they were unable to fully recover the animals from the disease.

Keywords: copaiba oil, nanoemulsion, hydrogel, anti-inflammatory, skin permeation, leishmaniasis

SUMÁRIO

Introdução	15
Objetivos	17
Revisão bibliográfica	18
Óleo de Copaíba	18
Via cutânea	20
Inflamação	23
Nanoemulsões.....	25
Hidrogéis.....	28
Leishmaniose	31
Capítulo I	51
<i>In vivo</i> acute anti-inflammatory activity from essential oils	53
Capítulo II.....	93
Determination of β -caryophyllene skin permeation/retention from crude copaiba oil (<i>Copaifera multijuga</i> Hayne) and respective oil-based nanoemulsion using novel HS-GC/MS method	95
Capítulo III	111
Nanoemulsification potentiates <i>in vivo</i> antiedematogenic effect of copaiba oil.....	113
Capítulo IV	135
Anti-inflammatory effect from a hydrogel containing nanoemulsified copaiba oil (<i>Copaifera multijuga</i> Hayne).....	137
Capítulo V	161
Copaiba oil and β -caryophyllene nanoemulsions anti-leishmanial activity	163
Discussão Geral	183
Conclusões	195
Anexos	201

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Inúmeras espécies de plantas medicinais são utilizadas diariamente pela população brasileira para o tratamento de doenças inflamatórias (JÚNIOR et al., 2011). Dentre estas plantas encontra-se a família das copaíferas. O óleo-resina retirado do tronco destas plantas é utilizado popularmente na região amazônica para processos inflamatórios das vias urinárias, das vias respiratórias e da pele (VEIGA-JUNIOR; PINTO, 2002). Alguns estudos já comprovaram que este óleo possui atividade anti-inflamatória (BASILE et al., 1988; VEIGA-JUNIOR et al., 2001, 2006, 2007; CARVALHO et al., 2005; GOMES et al., 2007, 2010; GELMINI et al., 2013), a qual é atribuída principalmente aos componentes majoritários do óleo, tais como o sesquiterpeno β -cariofileno, porém, sua textura e caráter untuoso o tornam pouco atrativo ao uso *in natura* por via tópica.

Nosso grupo de pesquisa vem estudando o desenvolvimento de nanoemulsões a base de óleo de copaíba na perspectiva de melhorar a ação anti-inflamatória tópica do óleo de copaíba visto que sistemas nanoestruturados podem penetrar até a derme (ALVES et al., 2007; PROW et al., 2011), região da pele onde acontecem os fenômenos típicos da inflamação.

Em um primeiro trabalho, desenvolvido por Dias e colaboradores (2012) foi realizada a otimização de um método de microextração em fase sólida (SPME) do β -cariofileno no modo *headspace* e validação de um método indicativo de estabilidade por cromatografia gasosa (CG) acoplada a detector de ionização de chama. Esse método foi utilizado para o doseamento e acompanhamento da estabilidade das formulações preparadas subsequentemente (DIAS et al., 2014) por dois métodos, homogeneização à alta pressão e emulsificação espontânea. A partir desse estudo de formulação, que empregou um planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} , foi selecionado o método de homogeneização à alta pressão para produzir as nanoemulsões e a composição que se mostrou mais adequada continha 20% (p/v) de óleo de copaíba, 10% (p/v) de triglicerídeos de cadeia média (com a finalidade de fixar o óleo volátil), 3% (p/v) de tensoativo lipofílico (Span 80[®]) e 1% (p/v) de tensoativo hidrofílico (Tween 20[®]).

No presente trabalho pretende-se, portanto, dar continuidade aos trabalhos realizados, visando ao estudo da atividade anti-inflamatória das nanoemulsões contendo óleo de copaíba e também a sua incorporação em formas farmacêuticas semissólidas, como os hidrogéis. Os resultados obtidos até então apontavam para a necessidade de: (i) validar uma metodologia bioanalítica sensível e que permita a quantificação do marcador em todas as camadas da pele e no fluido aceptor, durante os estudos de permeação cutânea em pele de orelha suína em células de difusão de Franz; (ii) avaliar a influência da incorporação de tensoativo catiônico na formulação, assim como o emprego de outras estratégias farmacotécnicas, tais como a incorporação em hidrogéis, na penetração cutânea do marcador e (iii) investigar atividade anti-inflamatória *in vivo* do óleo de copaíba associados às nanoemulsões. Outra perspectiva de estudo traçada, e também inédita, (iv) foi a investigação acerca da atividade leishmanicida do óleo extraído desta espécie e deste nanoemulsionado, já que alguns dados na literatura sugerem a possível atividade leishmanicida deste óleo, porém sem muita profundidade.

Na leishmaniose cutânea, a derme também se apresenta como a camada de interesse, pois é nela que os parasitos encontram-se internalizados por macrófagos (SILVEIRA et al., 2004). Tendo em vista que neste trabalho buscou-se aumentar a penetração dos compostos (avaliados através de seu principal marcador, o β -cariofileno) na derme, e que o óleo de copaíba apresenta uma promissora atividade leishmanicida (SANTOS et al., 2008; DOS SANTOS et al., 2011, 2012), despertou-se o interesse em estudar de maneira mais aprofundada esta atividade para as formulações desenvolvidas. Mais recentemente, foi demonstrado que o β -cariofileno isolado apresenta promissora atividade leishmanicida (SOARES et al., 2013). Estes achados, somados ao fato de que a leishmaniose cutânea é uma doença que afeta a população mundial, especialmente em países pouco desenvolvidos como o Brasil (WHO, 2014), abriram uma última perspectiva de estudo desta tese, que foi o estudo da atividade leishmanicida *in vitro* das nanoemulsões à base de óleo de copaíba.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desta tese foi desenvolver uma nova nanoemulsão de óleo de copaíba a partir de uma formulação otimizada, além de uma formulação semissólida, e avaliar as atividades anti-inflamatória (em modelos *in vivo*) e leishmanicida (em modelos *in vitro* e *in vivo*) das mesmas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar um método bioanalítico para determinação do componente majoritário do óleo de copaíba, β -cariofileno, em amostras de pele de orelha de porco e de fluido acceptor dos estudos em células de Franz, empregando-se cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas, no modo *headspace*;
- Realizar estudos de formulação com tensoativos catiônicos a fim de incrementar a permeação cutânea do composto majoritário do óleo a partir de nanoemulsões e hidrogéis derivados;
- Investigar o perfil de permeação cutânea *in vitro* do óleo de copaíba a partir das nanoemulsões selecionadas, incorporadas e não incorporadas a veículos semissólidos (hidrogéis), através do modelo da pele de orelha suína em células de difusão de Franz;
- Avaliar a atividade anti-edematogênica *in vivo* do óleo de copaíba associado às nanoemulsões, incorporadas ou não aos hidrogéis, através do modelo de edema de orelha de camundongo e de edema de pata de rato.

- Escrever um artigo de revisão da literatura sobre a utilização de óleos essenciais em pesquisas que utilizam modelos *in vivo* de inflamação, descrevendo os principais modelos usados para estudar a inflamação aguda em animais.
- Avaliar a atividade leishmanicida *in vitro* do óleo de copaíba e da nanoemulsão otimizada frente a diferentes espécies de *Leishmania* bem como a atividade *in vivo* em modelo de leishmaniose cutânea induzida por *Leishmania major*.

REVISÃO DA LITERATURA

ÓLEO DE COPAIBA

O gênero *Copaífera* L. abrange diversas espécies nativas do continente americano. Estas árvores, cuja altura pode chegar a 40 metros e que vivem até 400 anos, são facilmente encontradas nas regiões amazônica e centro-oeste do Brasil e são de grande interesse comercial, tanto pela extração do seu óleo quanto pela sua madeira (VEIGA-JUNIOR; PINTO, 2002; TAPPIN et al., 2004).

O óleo-resina extraído do tronco das copaíferas é constituído de uma parte resinosa, contendo principalmente diterpenos, e uma parte volátil, contendo principalmente sesquiterpenos. A retirada do óleo pode ser feita de diversas maneiras. Muitas delas prejudicam a árvore e podem levar à sua morte, mas a prática de coleta menos agressiva e menos prejudicial se dá pela inserção de um trado de metal no tronco da árvore. Após a remoção do trado, o óleo é coletado a partir do orifício produzido que é facilmente fechado após a coleta. O óleo extraído é utilizado sem a necessidade de purificação (CASCON; GILBERT, 2000; SILVA MEDEIROS, DA; VIEIRA, 2008; PIERI et al., 2009).

O óleo de copaíba é muito utilizado tradicionalmente na região amazônica onde é facilmente encontrado em mercados populares do local, sendo administrado tanto pela via tópica quanto pela via oral (LEANDRO et al., 2012). Os seus principais efeitos farmacológicos descritos na medicina popular são a atividade anti-inflamatória e a atividade

cicatrizante. Alguns estudos científicos vêm comprovando estas hipóteses, descrevendo a eficácia do óleo tanto *in vivo* quanto *in vitro* (BASILE et al., 1988; VEIGA-JUNIOR et al., 2001; CARVALHO et al., 2005; GOMES et al., 2007; SILVA et al., 2009; GELMINI et al., 2013; DIAS et al., 2014; SANTIAGO et al., 2015).

Atualmente, existem diversas pesquisas na literatura com óleo de copaíba, onde foram verificadas outras atividades, tais como antimicrobiana (PIERI et al., 2012; SANTOS et al., 2012; MORELLI et al., 2015), antitumoral (GOMES et al., 2008), leishmanicida (SANTOS et al., 2012; GUPTA et al., 2015), antisséptica (BOTELHO et al., 2014), hepatoprotetora (HENRIQUES et al., 2014), gastroprotetora (PAIVA et al., 1998), antinociceptiva (GOMES et al., 2007).

β -cariofileno

Os constituintes do óleo de copaíba podem variar muito quanto a espécie de *Copaifera* estudada (CASCON; GILBERT, 2000; VEIGA-JUNIOR et al., 2007). Normalmente, utiliza-se o β -cariofileno como marcador deste óleo, já que ele está presente em maior ou menor quantidade em todos os óleos de copaíba já descritos na literatura (LEANDRO et al., 2012). O β -cariofileno é um sesquiterpeno bicíclico e, além do óleo de copaíba, ocorre naturalmente nos óleos essenciais de outras plantas como *Eugenia caryophyllata* L. e *Cannabis sativa* L. Devido ao seu odor característico, é também utilizado na indústria de perfumes e flavorizantes, sendo descrito na lista de substâncias flavorizantes autorizados na Europa (SARPIETRO et al., 2015).

Na literatura científica, o β -cariofileno já foi descrito como anti-inflamatório (FERNANDES et al., 2007; GERTSCH et al., 2008; KLAUKE et al., 2014), e no tratamento de enfermidades relacionadas à inflamação, tais como na antinocicepção (GHELARDINI et al., 2001; PAULA-FREIRE et al., 2014) na prevenção da colite (CHO et al., 2007) e no tratamento da endometriose (ABBAS et al., 2013). Além disso, foi demonstrado que o β -cariofileno é um ligante seletivo e agonista não-psicoativo dos receptores canabinóides CB₂, apresentando-se como uma potencial estratégia no tratamento da inflamação, dor, aterosclerose e osteoporose (GERTSCH et al., 2008).

Dentre os estudos tecnológicos e analíticos realizados com esta molécula podem-se citar os trabalhos de Liu et al. (2013) e Dias et al. (2012). A complexação com β -ciclodextrina, descrita por Liu e colaboradores (2013), teve como objetivo diminuir a volatilização e aumentar a solubilidade em água, tendo sido avaliada a sua dissolução *in vitro* e a sua biodisponibilidade *in vivo*. Neste estudo, o complexo de inclusão foi produzido com sucesso, apresentando rápida liberação no teste de dissolução e uma melhora na biodisponibilidade oral comparado à molécula não complexada.

Dias e colaboradores (2012) desenvolveram e validaram um método para quantificação do β -cariofileno em nanoemulsões contendo óleo de copaiba, que utiliza microextração em fase sólida (SPME) e cromatografia gasosa (CG). Este trabalho descreve a otimização dos parâmetros de extração do β -cariofileno das formulações preparadas à base de óleo de copaíba por HS-SPME-CG/FID, utilizando planejamento fatorial Box–Behnken 3³. Melhores níveis de β -cariofileno foram encontrados quando a extração foi feita sem adição de NaCl, à temperatura de 45°C e após 20 minutos de exposição da fibra de SPME. O método analítico de doseamento do β -cariofileno em nanoemulsões mostrou-se linear, preciso, exato e robusto e nos testes de degradação forçada (hidrólise ácida e básica e exposição à oxidação, temperatura e luz) observou-se efeito parcialmente protetor das nanoemulsões sobre a degradação do β -cariofileno frente às condições de hidrólise ácida, oxidação, temperatura e luz.

VIA CUTÂNEA

A pele é uma barreira biológica que impede a entrada de agentes exógenos químicos, físicos e microrganismos e que protege o organismo contra a perda de água (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995). Este órgão é dividido basicamente em duas camadas: epiderme e derme (JAIN et al., 2014).

O estrato córneo é a camada mais externa da epiderme e atua propriamente como a barreira da pele, sendo composto por corneócitos envolvidos em uma matriz lipídica rica em proteínas. O estrato córneo representa a etapa limitante no transporte de fármacos pela pele que pode ocorrer basicamente por três vias: transcelular, intercelular e transfolicular

(PROW et al., 2011). Na derme, camada abaixo da epiderme, encontram-se as terminações nervosas, vasos sanguíneos e as fibras elásticas que dão sustentação à pele (CEVC; VIERL, 2010). Nesta camada é onde ocorrem as condições inflamatórias que acometem a pele além das doenças de fundo alérgico (JAIN et al., 2014).

A hipoderme, apesar de ser constituída de células da mesma origem da derme, não faz parte da pele. Esta camada serve de sustentação e conexão com os órgãos subjacentes e é onde se encontram a gordura subcutânea e a base das glândulas sebáceas e dos folículos capilares (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995; JAIN et al., 2014).

O interesse pela via cutânea vem aumentando nos últimos anos, principalmente para terapias de uso local, como para analgesia e atividade anti-inflamatória, mas também para liberação de substâncias na circulação (LEITE-SILVA et al., 2012). A via tópica é uma alternativa para a administração de fármacos, permitindo uma entrega sustentada para a corrente circulatória e evitando efeitos adversos que provém da administração oral ou parenteral. Entretanto, existem desafios para esta via de administração, já que o estrato córneo forma uma barreira micrométrica que regula a passagem de agentes externos, tornando-se, assim, um passo limitante da penetração cutânea (CROSER et al., 2009; CEVC; VIERL, 2010; PROW et al., 2011; BOLZINGER et al., 2012).

Permeação cutânea

O termo geral absorção cutânea descreve o processo da passagem de substâncias através da pele, o qual pode ser dividido em três etapas: penetração cutânea (entrada de uma substância na pele, mais especificamente a passagem pelo estrato córneo), permeação cutânea (passagem de uma substância pelas camadas da pele) e absorção cutânea (chegada de uma substância no sistema circulatório como nos linfonodos e vasos sanguíneos) (BARTOSOVA; BAJGAR, 2012).

A absorção cutânea de fármacos depende tanto da estrutura da pele quanto das características da molécula estudada e do veículo em que esta está incorporada. Em relação à pele, os fatores que influenciam a penetração de substâncias são a integridade do tecido (já que em certas condições o estrato córneo fica danificado, tais como em infecções,

inflamações, dermatites, psoríase, queimaduras, baixa umidade no ambiente, danos físicos) e também a região corporal e densidade de folículos pilosos (BAROLI, 2010; LEITE-SILVA et al., 2012).

Quanto à molécula a ser estudada, os fatores que influenciam sua capacidade de penetrar a barreira da pele são: pK_a (apenas moléculas não ionizadas penetram a pele), coeficiente de partição óleo/água (moléculas lipofílicas penetram o estrato córneo facilmente, mas tem dificuldade de passar pelas outras camadas), massa molecular e coeficiente de difusão. Além disso, a composição e as características físico-químicas do veículo também influenciam no processo de absorção cutânea e devem ser levadas em consideração em estudos de permeação (BAROLI, 2010; LEITE-SILVA et al., 2012)

A maioria dos trabalhos na literatura vem apresentando estudos de permeação cutânea *in vitro* utilizando, principalmente, pele de porco que é similar à pele humana (SCHMOOK et al., 2001; BARBERO; FRASCH, 2009). A pele humana também é utilizada, porém em menor escala, pois sua disponibilidade é muito menor e pode apresentar variabilidades como gênero, idade e local anatômico de origem do doador (BARBERO; FRASCH, 2009). Também existem peles de origem sintética, obtidas a partir de pele de animal liofilizada, através da engenharia de tecidos (modelo de epiderme humana reconstruída: EpiSkin®, EpiDerm®, SkinEthic®) ou através de modelos de pele artificial (membrana de polidimetilsiloxano, células PAMPA modificadas com ceramidas, etc) (FLATEN et al., 2015).

A metodologia mais empregada para a avaliação da permeação cutânea *in vitro* é feita em células de difusão de Franz estática, onde pode-se modificar parâmetros como temperatura, dose aplicada, constituição do fluido acceptor e área de difusão (GODIN; TOUITOU, 2007). Normalmente a temperatura utilizada neste teste a fim de mimetizar a temperatura da pele humana é de $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. O fluido acceptor é usualmente constituído de tampão fosfato ou solução salina adicionado ou não de uma quantidade limitada de solvente orgânico (etanol, metanol, isopropanol) ou tensoativos (polissorbato, laurilsulfato de sódio) que facilitam a solubilização de substâncias lipofílicas e garantem as condições Sink (FDA, 1997; BARTOSOVA; BAJGAR, 2012).

Ao final do experimento as camadas da pele podem ser facilmente separadas utilizando-se técnicas simples. O estrato córneo é separado pela técnica do *tape-stripping* e a epiderme é separada da derme com bisturi (podendo ser submetida a temperatura de até 60 °C) (FDA, 1997; ESCOBAR-CHÁVEZ et al., 2008; KLANG et al., 2012).

INFLAMAÇÃO

Em geral, a inflamação é uma resposta à infecção, lesão ou exposição a partículas externas, levando ao extravasamento local de células sanguíneas e fluidos. Normalmente, é descrita pelos quatro sinais clássicos: calor, dor, vermelhidão e inchaço (RYAN; MAJNO, 1977; FULLERTON; GILROY, 2016).

A primeira resposta ao à lesão é intermediada por macrófagos teciduais, mastócitos e outras células residentes, levando à produção de mediadores inflamatórios, tais como histamina, prostaglandinas e leucotrienos, que, por consequência, induzem o aumento da permeabilidade vascular e migração de células (neutrófilos e monócitos). Os neutrófilos liberam espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO e ERN) que podem danificar tanto o patógeno quanto o tecido não inflamado. Os monócitos iniciam o reparo tecidual, removendo células mortas no tecido lesado. A infiltração de células também é mediada por citosinas, tais como interleucinas (IL-6, IL-8, IL-12, IL-15), interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) estimulados pela regulação nuclear através da ativação de NF- κ B. Se a lesão continuar, a fase aguda da inflamação é alterada para um estado crônico, levando a formação de granuloma e de tecido linfático terciário (RYAN; MAJNO, 1977; MEDZHITOV, 2008; ASHLEY et al., 2012).

O tratamento mais comumente utilizado hoje é feito através do uso de anti-inflamatórios não-esteroides (AINEs). O mecanismo de ação destes fármacos se dá pela inibição das formas 1 e 2 da enzima cicloxigenase (COX-1 e COX-2), que, por consequência, inibe a produção de prostaglandinas. A COX-1 é responsável, entre outras funções, pela proteção gastrointestinal e a COX-2, por outro lado, é a responsável pelo processo inflamatório nas células do corpo. Como a maioria dos AINEs é administrada por

via oral, o principal efeito colateral são os distúrbios gastrointestinais, podendo chegar a hemorragias e úlceras gástricas (RANG et al., 2007).

Visto que o tratamento oral com anti-inflamatórios pode levar a sérios distúrbios, o tratamento tópico com estes fármacos vem apresentando grande interesse pelos usuários, já que a apresenta apenas efeito local, sem ou com raros efeitos adversos sistêmicos (HAROUTIUNIAN et al., 2010). Além disso, o tratamento com anti-inflamatórios tópicos diminui a dose administrada e também a interação com outros fármacos quando comparado com a administração pela via oral (RAZA et al., 2014). Na literatura, encontram-se diversos trabalhos abordando o uso tópico de anti-inflamatórios, tanto com fármacos já conhecidos como com produtos extraídos de plantas (MCPHERSON; CIMINO, 2013; MO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013; VERAS et al., 2013; RAZA et al., 2014).

Existem diversos métodos para avaliar a atividade anti-inflamatória tópica, que podem ser divididos entre inflamação aguda e crônica. Os modelos agudos são normalmente induzidos por agentes flogísticos que promovem a liberação de mediadores inflamatórios, enquanto os modelos crônicos são induzidos pela implantação subcutânea de corpos estranhos, que promovem a formação de granulomas. Dentre os modelos de inflamação aguda pode-se citar o edema em pata de rato (induzido por carragenina, histamina ou formalina) e o edema em orelha de camundongo (induzido por xileno, óleo de cróton, ácido araquidônico, capsaicina ou fenol). Dentre os modelos de inflamação crônica pode-se citar o granuloma em ratos induzido por *pellet* de algodão (CARVALHO et al., 2005; SARAIVA et al., 2011; EDDOUKS et al., 2012).

Uma abordagem mais detalhadas desse tema com foco nos óleos essenciais e no óleo de copaiba em especial estão apresentados na forma de um artigo de revisão, apresentado no Capítulo I.

Atividade anti-inflamatória do óleo de copaiba

A espécie *Copaifera multijuga* Hayne vem demonstrando um potencial efeito anti-inflamatório em relação a outras espécies de *Copaifera*. Veiga Junior e colaboradores (2007) fizeram um estudo comparativo entre três espécies (*Copaifera cearensis* Huber ex

Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke e *Copaifera multijuga* Hayne) em relação à composição química de seus óleos e o efeito anti-inflamatório no modelo de pleurisia em camundongos. Neste trabalho, foi verificado que a espécie *Copaifera multijuga* Hayne apresentou um efeito mais potente de inibição da pleurisia na menor dose utilizada (100 mg/Kg), com diminuição no acúmulo de leucócitos totais e neutrófilos.

Gomes et al. (2010) e Veiga Junior et al. (2006) verificaram e compararam a atividade anti-inflamatória do óleo extraído de *Copaifera multijuga* Hayne e de suas frações em hexano, clorofórmio/diclorometano e metanol. Estas frações têm por objetivo separar componentes representantes das três classes de moléculas encontradas no óleo de copaíba: sesquiterpenos, sesquiterpenos oxigenados e diterpenos, respectivamente. Em relação à atividade anti-inflamatória, estes estudos demonstraram que as frações com hexano e clorofórmio/diclorometano tendem a apresentar resultados melhores ou muito semelhantes ao do óleo puro, já que nelas estão presentes componentes com efeito anti-inflamatório proeminente, como β -cariofileno, α -humuleno e óxido de cariofileno.

NANOEMULSÕES

Nanoemulsões são sistemas heterogêneos compostos por gotículas de óleo estabilizadas por surfactantes dispersas em um meio aquoso. O tamanho de gotícula considerado para descrever uma nanoemulsão diverge muito entre os trabalhos encontrados na literatura, podendo variar entre 50 e 500 nm. Para serem utilizadas pela via tópica na área farmacêutica podemos considerar uma variação entre 100 e 300 nm, o qual vai depender da quantidade de núcleo oleoso e tensoativos, concentração de fármaco e técnica de preparação (SONNEVILLE-AUBRUN et al., 2004; GUTIÉRREZ et al., 2008; LOVELYN; ATTAMA, 2011; BURGUERA; BURGUERA, 2012; SUTRADHAR; AMIN, 2013; WU et al., 2013). A formação de uma nanoemulsão se dá pela combinação de uma fase oleosa, uma fase aquosa, uma mistura de tensoativos que compõe a interface óleo/água e pela presença de uma força mecânica (MASON et al., 2006).

A escolha da composição e da concentração de fase oleosa é de extrema importância para a formação da nanoemulsão, assim como a solubilidade de fármacos nesta fase. Pode-

se utilizar tanto óleos de origem natural quanto sintética ou uma mistura destes, sendo que a concentração de núcleo oleoso varia entre 5 e 30% (SHAH et al., 2010).

A mistura de tensoativos também é importante para a formação de nanoemulsões, já que fará a estabilização da interface óleo/água no produto final. O principal aspecto para a escolha dos tensoativos é a sua toxicidade e a sua estabilidade. Existem muitas opções de tensoativos, tanto de origem natural como a lecitina (de ovo ou de soja), quanto sintéticos como o polisorbato e o monooleato de sorbitano (FLOYD, 1999; SONNEVILLE-AUBRUN et al., 2004).

As nanoemulsões podem ser produzidas de diversas maneiras, dependendo da substância ativa e excipientes a serem utilizados. Atualmente, os métodos mais citados na literatura são a homogeneização a alta pressão e a microfluidização, mas também pode-se citar a ultra-sonicação e a emulsificação espontânea (TADROS et al., 2004; ALMEIDA et al., 2008).

O método de homogeneização a alta pressão mostra-se muito vantajoso em relação aos outros, pois tem fácil escalonamento, curto tempo de produção e não utiliza solventes orgânicos. A sua única desvantagem seria a necessidade da compra de um equipamento específico para realizar a produção da nanoemulsão (PARDEIKE et al., 2009). Ainda, este método vem apresentando ótimos resultados no que se refere à veiculação de altas concentrações de fase oleosa em nanoemulsões, como descrito no estudo de Müller e colaboradores (2012), o qual relata a produção de nanoemulsões contendo até 40% de núcleo oleoso com baixo índice de polidispersão e tamanho de gotícula na faixa de 150 a 250 nm.

Após a sua produção, as nanoemulsões devem ser caracterizadas quanto as suas propriedades físicas, químicas e físico-químicas. Uma caracterização completa pode incluir: inspeção visual (presença de fenômenos como coalescência, floculação, separação da fase oleosa, mudança de coloração), doseamento da substância ativa, determinação do pH, tamanho de gotícula, carga de superfície ou potencial zeta, índice de polidispersão, densidade, viscosidade e morfologia (FLOYD, 1999; THAKUR et al., 2013).

Nanoemulsões de uso tópico

As nanoemulsões têm sido utilizadas em pesquisas recentes com a finalidade de aperfeiçoar o desempenho terapêutico de diversos fármacos lipofílicos, pois aumentam a sua solubilidade aparente, taxa de dissolução e permeação em membranas biológicas (FATHI et al., 2012; THAKUR et al., 2013). Além disso, as nanoemulsões podem ser utilizadas em todas as vias de administração e mostram-se muito vantajosas para tratamentos na via tópica, já que apresentam baixa irritabilidade, alto poder de penetração e alta capacidade de veicular grandes quantidades de fármacos (SONNEVILLE-AUBRUN et al., 2004; TADROS et al., 2004; MOU et al., 2008; MÜLLER et al., 2012).

Visto que muitos trabalhos demonstram o potencial das nanoemulsões na absorção pela pele deve-se levar em consideração alguns fatores que podem influenciar o processo de permeação cutânea desses carreadores. O reduzido tamanho de gotícula das nanoemulsões promove um aumento na superfície de contato com a pele, facilitando a sua entrada pelo estrato córneo, podendo formar reservatórios nesta camada e liberar lentamente os fármacos até as outras camadas. Além disso, acredita-se que uma carga de superfície positiva na gotícula da nanoemulsão pode interagir mais fortemente com as cargas negativas presentes no estrato córneo e facilitar a liberação de fármacos pela pele (YILMAZ; BORCHERT, 2006; SHAH et al., 2010; ABOLMAALI et al., 2011; SUTRADHAR; AMIN, 2013; THAKUR et al., 2013).

No que se refere ao uso tópico de nanoemulsões, diversos autores relatam as vantagens da administração cutânea destes carreadores, tanto para fármacos já conhecidos (ALAM et al., 2013; LAI et al., 2013; SANDIG et al., 2013; CIURLIZZA et al., 2014; KIM et al., 2014; YU et al., 2014), quanto para produtos naturais (BIDONE et al., 2014; DOMÍNGUEZ-VILLEGAS et al., 2014; LU et al., 2014). Em relação a fármacos anti-inflamatórios, as nanoemulsões já foram descritas como carreadores de nimesulida, celecoxibe, meloxicam, ibuprofeno, aceclofenaco, diclofenaco, flurbiprofeno, indometacina, cetoprofeno, hidro cortisona e piroxicam (SHAKEEL et al., 2010).

Nosso grupo de pesquisa também já estudou o desenvolvimento de nanoemulsões contendo o óleo de copaíba (DIAS et al., 2014). Neste trabalho foi verificada a composição

da nanoemulsão através de um desenho experimental, do tipo planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} , onde variou-se a concentração dos tensoativos Span 80® e Tween 20®, a concentração de óleo de copaíba, a presença de um óleo fixo (triglicerídeos de cadeia média) e também a diferença entre dois métodos de preparação: homogeneização a alta pressão e emulsificação espontânea. Como resposta, foram verificados parâmetros de caracterização físico-química (tamanho de gotícula, potencial zeta e índice de polidispersão) e teor de β -cariofileno.

Os resultados obtidos demonstraram que o método de homogeneização à alta pressão mostrou-se mais vantajoso para produzir nanoemulsões com óleo de copaíba e que a composição mais adequada da nanoemulsão contém 20% de óleo de copaíba, 10% de TCM, 3% Span 80® e 1% de Tween 20®. Após 90 dias de armazenamento a 4 e 25 °C, a temperatura de 4°C manteve as nanoemulsões com menos sinais de instabilidade e com menor perda da fração volátil do óleo de copaíba. Além disso, o emprego de TCM na formulação como óleo fixo provou ser uma boa estratégia para fixar a fração volátil do óleo de copaíba durante a preparação e o período de armazenamento. Assim, foi comprovado que este sistema permite que uma grande quantidade de óleo de copaíba seja veiculada e que, por consequência, uma elevada quantidade de β -cariofileno esteja disponível para exercer ação farmacológica (DIAS et al., 2014).

HIDROGÉIS

Hidrogéis são polímeros com a habilidade de intumescer na presença de soluções aquosas. A estrutura do polímero é capaz de reter grandes quantidades de água, porém, devido a presença de *cross-links*, eles são insolúveis nos solventes utilizados. As redes formadas por estes polímeros são reticuladas por ligações químicas ou outras forças coesivas, tais como interações iônicas, ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas (KIN et al., 1992; PEPPAS, 2000; HAMIDI et al., 2008).

Uma ampla gama de composições poliméricas tem sido utilizada na produção de hidrogéis, as quais podem ser classificadas baseadas em diversas características destes

polímeros, tais como natureza dos grupos laterais (aniônicos, catiônicos e neutros) e origem (sintéticos e naturais) (HOFFMAN, 2002; HAMIDI et al., 2008).

Dentre os hidrogéis utilizados em preparações farmacêuticas podemos citar os derivados do ácido poliacrílico, como o Carbopol® (polímeros sintéticos de natureza aniônica), os derivados de celulose como a hidroxietilcelulose (polímero semi-sintético de natureza não-iônica) e a quitosana (polímero de origem natural de natureza catiônica). Visto que existem muitas opções para o desenvolvimento de formulações tópicas utilizando-se hidrogéis, a escolha deve basear-se em requisitos como a estabilidade do produto final, liberação e eficácia da substância ativa.

A forma farmacêutica hidrogel é a uma interessante escolha para a administração tópica de compostos ativos, uma vez que apresenta um elevado teor de água, torna-se facilmente lavável e não deixa um aspecto gorduroso na pele, promovendo, assim, uma maior aceitação pelo usuário (LEONARDI et al., 2005). Além disso, a formulação de uso tópico contendo um sistema nanoemulsionado não deve apresentar maior afinidade pelo veículo do que pela pele. Assim, a incorporação em uma base hidrofílica tende a eliminar esse problema aumentando, também, a liberação dos componentes contidos na matriz do hidrogel (ALVES et al., 2007; BABOOTA et al., 2007; MOU et al., 2008).

Alguns estudos recentes vêm demonstrando o potencial da incorporação de nanoemulsões em hidrogéis relatando o aumento da permeação de compostos ativos através da pele (KARRI et al., 2015; KOOP et al., 2015; SAMPATHI et al., 2015). A fim de entender os mecanismos que regem a permeação cutânea de ativos pela pele, Khurana e colaboradores (2013) estudaram a interação de uma nanoemulsão de meloxicam incorporada em hidrogel de Carbopol® 940. Neste trabalho, os autores notaram uma modificação na estrutura dos lipídios intercelulares do estrato córneo após o ensaio de permeação cutânea com a formulação, sugerindo que a extração destes lipídios seja um importante mecanismo no aumento da passagem de ativos pela pele.

É importante ressaltar o estudo reológico de formulações semissólidas para o uso tópico, já que este parâmetro influencia no processo da aplicação na pele, assim como a influência da temperatura, do tempo e da incorporação de nanocarreadores (BECK et al.,

2011). Dependendo das características de fluxo e viscosidade, os materiais podem ser divididos entre fluidos não-Newtonianos e Newtonianos. Os fluidos Newtonianos tem viscosidade constante independente do cisalhamento aplicado (em uma dada temperatura), enquanto os fluidos não-Newtonianos mudam de viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento (ALLEN et al., 2011).

Segundo as características de deformação esses sistemas podem ser classificados em três grupos: pseudoplásticos, plásticos ou dilatantes. O comportamento mais comum para os hidrogéis é o pseudoplástico, pois quando a taxa de cisalhamento é aplicada há uma reestruturação nas cadeias poliméricas lineares no sentido da força aplicada. Assim, no reograma isso é apresentado como uma diminuição da viscosidade à medida que a tensão ou força de cisalhamento aumenta (NETZ; ORTEGA, 2002).

Para realizar a medida de viscosidade podem-se utilizar os viscosímetros do tipo Ostwald e de Höppler (para fluidos Newtonianos) e os viscosímetros rotatórios (para fluidos não-Newtonianos) (NETZ; ORTEGA, 2002). Um método complementar para a caracterização da viscosidade de formulações semissólidas de aplicação tópica é a determinação da espalhabilidade, característica que está profundamente ligada à aplicação da formulação no local de ação. O método usado para determinar a espalhabilidade é realizado pela sobreposição de placas sobre a amostra, visualizando-se o diâmetro atingido pela formulação (BORGHETTI; KNORST, 2006).

Normalmente, veículos semissólidos como os hidrogéis apresentam um fluxo não-Newtoniano, ao contrário das nanoemulsões que são fluidos Newtonianos, apresentando baixa viscosidade, próxima à da água. Assim, é importante avaliar a influência da incorporação destes sistemas em hidrogéis em relação aos aspectos reológicos como viscosidade e espalhabilidade.

LEISHMANIOSE

A leishmaniose é uma doença endêmica em países de clima tropical e é a segunda doença parasitária mais prevalente no mundo após a malária (KUMAR, 2013). Apesar de apresentar uma estimativa de vinte a quarenta mil mortes por ano, essa doença pertence ao

grupo das doenças negligenciada, já que a maioria dos afetados são pessoas pobres em países subdesenvolvidos (SAVOIA, 2015). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, existem 2 milhões de novos casos todos os anos e 350 mil pessoas consideradas em risco (WHO, 2010). A doença é transmitida pelo flebotomíneo, ou mosquito-palha (gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*), infectado com o parasito *Leishmania* spp, e pode levar a três tipos de manifestações clínicas: leishmaniose cutânea (LC), localizada ou difusa, leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose visceral (LV) (SAVOIA, 2015). No continente americano, a leishmaniose cutânea também é conhecida como leishmaniose tegumentar americana (LTA).

Existem diversas espécies de *Leishmania* que podem causar a leishmaniose e suas formas de manifestação clínica no ser humano (Tabela 1). Durante seu ciclo de vida, o parasito pode apresentar-se em duas formas: promastigota e amastigota. O vetor inocula a forma promastigota na pele do hospedeiro, que é fagocitada por macrófagos, onde se transforma na forma amastigota. No macrófago, o parasito se multiplica e infecta outros macrófagos, por consequência. Na leishmaniose cutânea, a infecção limita-se à pele e sistema linfático, podendo chegar em mucosas, como na boca, nariz e faringe (caracterizando a forma mucocutânea da doença, LMC). Já a forma visceral (LV), atinge órgãos internos vitais e pode ser fatal se não tratada (BAILEY; LOCKWOOD, 2007; PACE, 2014).

Além de humanos, o parasito da leishmaniose também utiliza outros mamíferos (domésticos e silvestres) como hospedeiros, como cachorros, gatos, cavalos, roedores e marsupiais (SAVOIA, 2015). Cachorros domésticos são hospedeiros importantes principalmente em áreas urbanas e contribuem na cadeia epidemiológica já que podem permanecer assintomáticos por longos períodos de tempo, contribuindo para a transmissão e manutenção da doença (DINIZ et al., 2008).

No Brasil, a leishmaniose está presente em todas as regiões, mais prevalentemente nas regiões norte e nordeste, e vem avançando das zonas rurais e florestais, principalmente devido ao desmatamento, mudanças climáticas e à migração de famílias para as zonas urbanas (LINDOSO; LINDOSO, 2009; DAWIT et al., 2013). Segundo o Ministério da

Saúde, foram reportados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) cerca de 20.000 casos confirmados de LTA e 3.000 de LV no país entre os anos de 2000 e 2013 (BRASIL. MINISTERIO DA SAUDE, 2015). As principais espécies de *Leishmania* causadoras da LTA no Brasil são *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis*, *L. naiffi*, *L. lainsoni*, *L. shawi* e *L. lindenbergi* (GUERRA et al., 2015). Os caso de LV no país são causados principalmente pela *L. infantum/chagasi* (LINDOSO; LINDOSO, 2009).

Tabela 1. Principais espécies causadoras de leishmaniose, suas localizações geográficas e manifestações clínicas (REITHINGER et al., 2007; PACE, 2014).

Espécie de <i>Leishmania</i>	Localização	Manifestação clínica
<i>L. aethiopica</i>	Etiópia, Quênia	Cutânea (localizada e difusa), mucocutânea
<i>L. amazonensis</i>	América do Sul	Cutânea (localizada e difusa)
<i>L. braziliensis</i>	América do Sul, partes da América Central, México	Cutânea (localizada), mucocutânea
<i>L. donovani</i>	África, centro e sudoeste asiático	Cutânea (localizada), visceral
<i>L. guyanensis</i>	América do Sul	Cutânea (localizada), mucocutânea
<i>L. infantum/L. chagasi</i>	Europa, norte da África, América central e América do Sul	Cutânea (localizada), visceral
<i>L. major</i>	Ásia central, norte e leste da África, Oriente-médio	Cutânea (localizada)
<i>L. mexicana</i>	América Central, México, Estados Unidos	Cutânea (localizada e difusa), mucocutânea
<i>L. panamensis</i>	América do Sul (norte) e América Central (sul)	Cutânea (localizada), mucocutânea
<i>L. peruviana</i>	Peru	Cutânea (localizada), mucocutânea
<i>L. tropica</i>	Centro e sudoeste asiático, norte da África e Oriente-médio	Cutânea (localizada)

Tratamentos para a leishmaniose

O tratamento de primeira escolha para a leishmaniose é feito com antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de meglumina (Glucantime[®], Aventis, França), e estibogluconato de sódio (Pentosan[®], GSK, Reino Unido). Seu mecanismo de ação ainda é pouco conhecido, mas sabe-se que são absorvidos pelos macrófagos, onde se transformam na forma ativa da molécula, que interfere em processos energéticos do parasito (SILVA-JARDIM et al., 2014). O tratamento com esses medicamentos pode ser administrado pelas vias intramuscular ou intravenosa para tratamentos contra a forma visceral e também intralesional para a forma cutânea da doença (MINODIER; PAROLA, 2007). No entanto, os antimoniais pentavalentes apresentam efeitos colaterais severos (mialgia, problemas cardíacos e renais, dor abdominal, dor de cabeça, etc), requerem longo tempo de tratamento e já apresentam casos de resistência (AMEEN, 2010).

Outros medicamentos utilizados no tratamento da leishmaniose são a pentamidina, a anfotericina B e a miltefosina. A pentamidina é utilizada como segunda escolha em pacientes refratários ou intolerantes ao tratamento com antimoniais. Pode ser utilizada para todas as formas da doença pela via intramuscular ou por infusão intravenosa, porém apresenta efeitos adversos que limitam seu uso, como diabetes *mellitus*, hipoglicemia, toxicidade cardíaca, hepática e renal. O seu mecanismo de ação também não está bem esclarecido, mas parece estar relacionado com danos na mitocôndria do parasito (SILVA-JARDIM et al., 2014).

A anfotericina B, apesar de ser um antifúngico, é considerada um leishmanicida de segunda geração e é utilizada em casos onde os antimoniais pentavalentes falharam. Seu mecanismo de ação se dá pela ligação com os esteróis da membrana celular do parasito, levando à morte celular. Devido a sua toxicidade e efeitos adversos gerados pela administração da anfotericina B, formulações lipídicas (lipossoma, dispersão coloidal e complexo lipídico) contendo este fármaco são atualmente utilizadas no tratamento da leishmaniose, resolvendo problemas como urticária e insuficiência renal. Porém são medicamentos caros, o que pode prejudicar o tratamento em países mais pobres (CHÁVEZ-FUMAGALLI et al., 2015).

A miltefosina foi o primeiro leishmanicida oral a ser produzido e pode ser utilizado em todas as formas clínicas de leishmaniose. No entanto, apresenta limitações como alto custo e efeitos adversos como náusea, vômitos, toxicidade hepática e renal e teratogenicidade. Seu mecanismo de ação se dá pela inibição da biosíntese de fosfolipídios e esteróis (KEVRIC et al., 2015; SAVOIA, 2015).

Atividade leishmanicida do óleo de copaíba

A atividade leishmanicida do óleo de copaíba já foi demonstrada em alguns trabalhos publicados na literatura, entretanto os resultados são muito variáveis, dada a quantidade de espécies existentes da planta e de suas características individuais. Os testes avaliam principalmente a atividade *in vitro* do óleo nas formas promastigota e amastigota axênica do parasito além da forma mais interessante ao tratamento da doença, a forma amastigota intramacrofágica. A Tabela 2 apresenta os valores de CI_{50} (concentração inibitória de 50% dos parasitas) encontrados nos trabalhos citados, bem como valores de CC_{50} (concentração citotóxica para 50% das células) para os macrófagos não infectados.

Santos e colaboradores (2008) descreveram a atividade leishmanicida para o óleo de nove espécies de *Copaifera* encontradas no Brasil (*C. reticulata*, *C. martii*, *C. cearensis*, *C. paupera*, *C. langsdorfii*, *C. officinalis*, *C. multijuga* e *C. lucens*) em *Leishmania amazonensis*. Dentre todas as espécies, a que melhor apresentou atividade na forma promastigota foi a amostra de *C. reticulata* (IC_{50} de 5,0 $\mu\text{g/mL}$). Já nas formas amastigota axênica e amastigota intracelular esta amostra apresentou valores maiores de IC_{50} (15,0 e 20,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente).

Em seguida, o mesmo grupo de pesquisa (SANTOS et al., 2011) testou o efeito do tratamento oral, tópico ou subcutâneo do óleo de copaíba (*Copaifera martii*, em formulação semissólida ou não) em modelo de leishmaniose cutânea (*Leishmania amazonensis*) em pata de camundongos BALB/c. O tratamento oral conjugado ao tratamento tópico demonstrou ser eficaz na diminuição da lesão quando comparado aos controles positivo e negativo. Entretanto, os tratamentos tópico e subcutâneo não foram capazes de fazer o mesmo. Além disso, após o tratamento com o óleo de *Copaifera reticulata* Ducke,

mudanças importantes na morfologia dos parasitos foram verificadas em microscópio eletrônico, como modificação no formato das células e aumento do tamanho da mitocôndria (SANTOS et al, 2012).

Em trabalho mais recente, Gupta e colaboradores (2015) produziram uma nanoemulsão contendo óleo de copaíba e anfotericina B, obtendo valores baixos de IC₅₀ nas formas amastigotas intramacrofágicas de *Leishmania donovani*, valores ainda menores do que os apresentados nos trabalhos anteriores, tanto para a nanoemulsão contendo o óleo quanto para o óleo puro. Ainda, os autores afirmam que os resultados obtidos decorrem do efeito sinérgico entre o óleo e a anfotericina B, porém não foram feitos testes de sinergismo para confirmar esta afirmação.

Já foi demonstrado também o efeito de alguns dos componentes majoritários do óleo de copaíba, como o β -cariofileno e ácidos diterpênicos isolados a partir do óleo. Soares e colaboradores (2013) compararam amostras de óleo de copaíba ricas no sesquiterpeno β -cariofileno, duas frações (uma rica em sesquiterpenos e uma rica em diterpenos) e o padrão de β -cariofileno. Neste trabalho, as amostras apresentam valores baixos de IC₅₀ na forma amastigota intramacrofágica do parasito *Leishmania amazonensis*, com valores 20 vezes menores comparados aos apresentados por Santos et al. (2008). Tanto a fração rica em sesquiterpenos quanto o β -cariofileno apresentaram atividade leishmanicida similar ao óleo na forma amastigota. Já a fração rica em diterpenos foi ativa apenas na concentração mais alta testada.

Santos e colaboradores (2013) isolaram 6 ácidos diterpênicos de óleos de copaíba e testados na formas promastigota e amastigota de *Leishmania amazonensis*. Os diterpenos mais ativos contra as formas promastigotas foram o ácido hidroxipálico e o metilcopalato (IC₅₀ de 2,5 e 6,0 μ g/mL, respectivamente) e contra as formas amastigotas foram o ácido pinifólico e o ácido kaurenoico (IC₅₀ de 4,0 e 3,5 μ g/mL, respectivamente). Além disso, foram visualizadas em microscópio eletrônico alterações estruturais após o tratamento com ácido hidroxipálico, tais como ruptura da membrana plasmática, perda de conteúdo celular e alterações na membrana flagelar.

Tabela 2. Valores de CI_{50} do óleo de copaíba encontrados para diferentes formas do parasito causador da leishmaniose nos diferentes trabalhos na literatura.

Referência	Espécie de <i>Leishmania</i>	Espécie de <i>Copaifera</i>	Forma estudada	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Santos et al., 2008	<i>L. amazonensis</i>	<i>C. reticulata</i>	Promastigota	5,00	37,50
			Amastigota axênica	15,00	
			Amastigota intramacrofágica	20,00	
Soares et al., 2013	<i>L. amazonensis</i>	Amostras comerciais, sem especificação	Amastigota intramacrofágica	2,30 – 2,90	50,00
		Amostra comercial, sem especificação	Amastigota intramacrofágica	Óleo: 0,38 NE-óleo: 0,33 NE-óleo-AB: 0,018	20,00

NE-óleo: Nanoemulsão contendo óleo de copaíba; NE-óleo-AB: Nanoemulsão contendo óleo de copaíba e anfotericina B

REFERÊNCIAS

ABBAS, M. A.; TAHA, M. O.; ZIHLIF, M. A.; DISI, A. M. β -Caryophyllene causes regression of endometrial implants in a rat model of endometriosis without affecting

fertility. **European Journal of Pharmacology**, v. 702, n. 1–3, p. 12–19, 2013.

ABOLMAALI, S. S.; TAMADDON, A. M.; FARVADI, F. S.; DANESHAMUZ, S.; MOGHIMI, H. Pharmaceutical nanoemulsions and their potential topical and transdermal applications. **Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 3, p. 139–150, 2011.

ALAM, M. S.; ALI, M. S.; ALAM, N.; et al. In vivo study of clobetasol propionate loaded nanoemulsion for topical application in psoriasis and atopic dermatitis. **Drug Invention Today**, v. 5, n. 1, p. 8–12, 2013.

ALLEN, L. V. J.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Ansel's pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems**. 9th ed. Baltimore: Wolters Kluwer, 2011.

ALMEIDA, M. E.; TEIXEIRA, H. F.; KOESTER, L. S. Preparação de emulsões submicrométricas: aspectos teóricos sobre os métodos empregados na atualidade. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, p. 780–788, 2008.

ALVES, M. P.; SCARRONE, A. L.; SANTOS, M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, n. 1–2, p. 215–220, 2007.

AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 35, n. 7, p. 699–705, 2010.

ARORA, R.; AGGARWAL, G.; HARIKUMAR, S. L.; KAUR, K. Nanoemulsion based hydrogel for enhanced transdermal delivery of ketoprofen. **Advances in Pharmaceutics**, v. 2014, p. 1–12, 2014.

ASHLEY, N. T.; WEIL, Z. M.; NELSON, R. J. Inflammation: Mechanisms, costs, and natural variation. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 43, n. 1, p. 385–406, 2012.

BABOOTA, S.; SHAKEEL, F.; AHUJA, A.; ALI, J.; SHAFIQ, S. Design, development and evaluation of novel nanoemulsion formulations for transdermal potential of celecoxib. **Acta Pharmaceutica**, v. 57, n. 3, p. 315–332, 2007.

BAILEY, M. S.; LOCKWOOD, D. N. J. Cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 203–211, 2007.

BARBERO, A. M.; FRASCH, H. F. Pig and guinea pig skin as surrogates for human in

vitro penetration studies: a quantitative review. **Toxicology in Vitro**, v. 23, n. 1, p. 1–13, 2009.

BAROLI, B. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: fiction or reality? **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 1, p. 21–50, 2010.

BARTOSOVA, L.; BAJGAR, J. Transdermal drug delivery in vitro using diffusion cells. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 27, p. 4671–4677, 2012.

BASILE, A. C.; SERTIÉ, J. A. A.; FREITAS, P. C. D.; ZANINI, A. C. Anti-inflammatory activity of oleoresin from brazilian copaifera. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, p. 101–109, 1988.

BECK, R.; GUTERRES, S.; POHLMANN, A. (EDS.). **Nanocosmetics and Nanomedicines**. 1st ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011.

BIDONE, J.; ZORZI, G. K.; CARVALHO, E. L. S.; et al. Incorporation of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC extracts into topical nanoemulsions obtained by means of spontaneous emulsification procedure. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 421–429, 2014.

BOLZINGER, M.; BRIANÇON, S.; PELLETIER, J.; CHEVALIER, Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, n. 3, p. 156–165, 2012.

BORGHETTI, G. S.; KNORST, M. T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 4, p. 531–537, 2006.

BOTELHO, N. M.; SILVEIRA, E. L.; LOPES, L. N.; et al. Copaiba oil effect under different pathways in mice subjected to sepsis. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 29, n. 8, p. 528–531, 2014.

BRASIL. MINISTERIO DA SAUDE. Sistema de informação de agravos de notificação - SINAN. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>>. .

BURGUERA, J. L.; BURGUERA, M. Analytical applications of emulsions and microemulsions. **Talanta**, v. 96, p. 11–20, 2012.

CARVALHO, J. C. T.; CASCON, V.; POSSEBON, L. S.; et al. Topical antiinflammatory

and analgesic activities of *Copaifera duckei* Dwyer. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 11, p. 946–950, 2005.

CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 773–778, 2000.

CEVC, G.; VIERL, U. Nanotechnology and the transdermal route: a state of the art review and critical appraisal. **Journal of Controlled Release**, v. 141, n. 3, p. 277–299, 2010.

CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; RIBEIRO, T. G.; CASTILHO, R. O.; et al. New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 3, p. 235–242, 2015.

CHO, J. Y.; CHANG, H.-J.; LEE, S.-K.; et al. Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by oral administration of β -caryophyllene, a sesquiterpene. **Life Sciences**, v. 80, n. 10, p. 932–939, 2007.

CIURLIZZA, C.; FERNÁNDEZ, F.; CALPENA, A. C.; et al. Semisolid formulations containing cetirizine: human skin permeation and topical antihistaminic evaluation in a rabbit model. **Archives of Dermatological Research**, v. 306, n. 8, p. 711–717, 2014.

CROSER, M.; BOVENZI, M.; MAINA, G.; et al. Nanoparticle dermal absorption and toxicity: a review of the literature. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 82, n. 9, p. 1043–1055, 2009.

DAWIT, G.; GIRMA, Z.; SIMENEW, K. A review on biology, epidemiology and public health significance of leishmaniasis. **Journal of Bacteriology & Parasitology**, v. 4, n. 2, p. 1–7, 2013.

DIAS, D. D. O.; COLOMBO, M.; KELMANN, R. G.; et al. Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of β -caryophyllene in a nanoemulsion dosage form prepared with copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil. **Analytica Chimica Acta**, v. 721, p. 79–84, 2012.

DIAS, D. DE O.; COLOMBO, M.; KELMANN, R. G.; et al. Optimization of copaiba oil-based nanoemulsions obtained by different preparation methods. **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 154–162, 2014.

DIAS, D.; FONTES, L.; CROTTI, A.; et al. Copaiba oil suppresses inflammatory cytokines in splenocytes of C57Bl/6 mice induced with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 12814–12826, 2014.

DINIZ, S. A.; SILVA, F. L.; CARVALHO NETA, A. C.; et al. Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 2, n. 1, p. 24–33, 2008.

DOMÍNGUEZ-VILLEGAS, V.; CLARES-NAVEROS, B.; GARCÍA-LÓPEZ, M. L.; et al. Development and characterization of two nano-structured systems for topical application of flavanones isolated from *Eysenhardtia platycarpa*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 116, p. 183–192, 2014.

EDDOUKS, M.; CHATTOPADHYAY, D.; ZEGGWAGH, N. A. Animal models as tools to investigate antidiabetic and anti-inflammatory plants. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, n. Article ID 142087, p. 14 pages, 2012.

ESCOBAR-CHÁVEZ, J. J.; MERINO-SANJUÁN, V.; LÓPEZ-CERVANTES, M.; et al. The tape-stripping technique as a method for drug quantification in skin. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 1, p. 104–130, 2008.

FATHI, M.; MOZAFARI, M. R.; MOHEBBI, M. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. **Trends in Food Science & Technology**, v. 23, n. 1, p. 13–27, 2012.

FDA. **Guidance for industry: nonsterile semisolid dosage forms**. 1997.

FERNANDES, E. S.; PASSOS, G. F.; MEDEIROS, R.; et al. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (–)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v. 569, n. 3, p. 228–236, 2007.

FLATEN, G. E.; PALAC, Z.; ENGESLAND, A.; et al. *In vitro* skin models as a tool in optimization of drug formulation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 75, p. 10–24, 2015.

FLOYD, A. G. Top ten considerations in the development of parenteral emulsions. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 2, n. 4, p. 134–146, 1999.

FULLERTON, J. N.; GILROY, D. W. Resolution of inflammation: A new therapeutic

frontier. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. advance on, n. 8, p. 551–567, 2016.

GELMINI, F.; BERETTA, G.; ANSELMINI, C.; et al. GC–MS profiling of the phytochemical constituents of the oleoresin from *Copaifera langsdorffii* Desf. and a preliminary in vivo evaluation of its antipsoriatic effect. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 440, n. 2, p. 170–178, 2013.

GERTSCH, J.; LEONTI, M.; RADUNER, S.; et al. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 26, p. 9099–9104, 2008.

GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; CESARE MANNELLI, L. DI; MAZZANTI, G.; BARTOLINI, A. Local anaesthetic activity of β -caryophyllene. **Il Farmaco**, v. 56, n. 5–7, p. 387–389, 2001.

GODIN, B.; TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: predictions for humans from *in vivo*, *ex vivo* and animal models. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 11, p. 1152–1161, 2007.

GOMES, N. D. M.; REZENDE, C. D. M.; FONTES, S. P.; et al. Antineoplastic activity of *Copaifera multijuga* oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich tumor. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 1, p. 179–184, 2008.

GOMES, N. D. M.; REZENDE, C. M. DE; FONTES, S. P.; et al. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of fractions obtained from *Copaifera multijuga* Hayne. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 1, p. 177–183, 2010.

GOMES, N. M.; REZENDE, C. M.; FONTES, S. P.; MATHEUS, M. E.; FERNANDES, P. D. Antinociceptive activity of amazonian copaiba oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 486–492, 2007.

GUERRA, J. A. DE O.; MACIEL, M. G.; GUERRA, M. V. DE F.; et al. Tegumentary leishmaniasis in the State of Amazonas: what have we learned and what do we need? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p. 12–19, 2015.

GUPTA, P. K.; JAISWAL, A. K.; ASTHANA, S.; et al. Synergistic enhancement of parasitocidal activity of amphotericin B using copaiba oil in nanoemulsified carrier for oral delivery: an approach for non-toxic chemotherapy. **British Journal of Pharmacology**, v.

172, n. 14, p. 3596–3610, 2015.

GUTIÉRREZ, J. M.; GONZÁLEZ, C.; MAESTRO, A.; et al. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 13, n. 4, p. 245–251, 2008.

HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 15, p. 1638–1649, 2008.

HAROUTIUNIAN, S.; DRENNAN, D. A.; LIPMAN, A. G. Topical NSAID therapy for Musculoskeletal pain. **Pain Medicine**, v. 11, n. 4, p. 535–549, 2010.

HENRIQUES, M. V. B.; COSTA, F. D.; VASCONCELOS, D. M. DE; et al. Attenuation of copaiba oil in hepatic damage in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 29, n. 12, p. 776–780, 2014.

HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 43, p. 3–12, 2002.

JAIN, A.; JAIN, P.; KURMI, J.; et al. Novel strategies for effective transdermal drug delivery: a review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 31, n. 3, p. 219–272, 2014.

JALÓN, E. G. DE; JOSA, M.; CAMPANERO, M. A.; SANTOYO, S.; YGARTUA, P. Determination by high-performance liquid chromatography of ketoprofen *in vitro* in rat skin permeation samples. **Journal of Chromatography A**, v. 870, n. 1–2, p. 143–149, 2000.

JÚNIOR, W. S. F.; LADIO, A. H.; ALBUQUERQUE, U. P. DE. Resilience and adaptation in the use of medicinal plants with suspected anti-inflammatory activity in the Brazilian Northeast. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, n. 1, p. 238–252, 2011.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 8th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

KARRI, V. V. S. N. R.; RAMAN, S. K.; KUPPUSAMY, G.; et al. Terbinafine hydrochloride loaded nanoemulsion based gel for topical application. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 45, n. 1, p. 79–89, 2015.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New world and old world leishmania

infections. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579–593, 2015.

KHURANA, S.; JAIN, N. K.; BEDI, P. M. S. Nanoemulsion based gel for transdermal delivery of meloxicam: physico-chemical, mechanistic investigation. **Life Sciences**, v. 92, n. 6–7, p. 383–392, 2013.

KIM, J. H.; KO, J. A.; KIM, J. T.; et al. Preparation of a capsaicin-loaded nanoemulsion for improving skin penetration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 3, p. 725–732, 2014.

KIN, S. W.; BAE, Y. H.; OKANO, T. Hydrogels: swelling, drug loading and release. **Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 3, p. 283–290, 1992.

KLANG, V.; SCHWARZ, J. C.; LENOBEL, B.; et al. *In vitro* vs. in vivo tape stripping: validation of the porcine ear model and penetration assessment of novel sucrose stearate emulsions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, n. 3, p. 604–614, 2012.

KLAUKE, A.-L.; RACZ, I.; PRADIER, B.; et al. The cannabinoid CB2 receptor-selective phytocannabinoid beta-caryophyllene exerts analgesic effects in mouse models of inflammatory and neuropathic pain. **European Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 4, p. 608–620, 2014.

KOOP, H. S.; FREITAS, R. A. DE; SOUZA, M. M. DE; SAVI-JR., R.; SILVEIRA, J. L. M. Topical curcumin-loaded hydrogels obtained using galactomannan from *Schizolobium parahybae* and xanthan. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, p. 229–236, 2015.

KUMAR, A. **Leishmania and Leishmaniasis**. 1st ed. New York, NY: Springer New York, 2013.

LAI, F.; PIREDDU, R.; CORRIAS, F.; et al. Nanosuspension improves tretinoin photostability and delivery to the skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 458, n. 1, p. 104–109, 2013.

LEANDRO, L. M.; VARGAS, F. DE S.; BARBOSA, P. C. S.; et al. Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 3866–3889, 2012.

LEITE-SILVA, V. R.; ALMEIDA, M. M. DE; FRADIN, A.; GRICE, J. E.; ROBERTS, M.

S. Delivery of drugs applied topically to the skin. **Expert Review of Dermatology**, v. 7, n. 4, p. 383–397, 2012.

LEONARDI, F.; DERAİL, C.; MARIN, G. Some applications of molecular rheology: polymer formulation and molecular design. **Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics**, v. 128, n. 1, p. 50–61, 2005.

LIMA SILVA, J. J. DE; GUIMARÃES, S. B.; SILVEIRA, E. R. DA; et al. Effects of *Copaifera langsdorffii* Desf. on ischemia-reperfusion of randomized skin flaps in rats. **Aesthetic Plastic Surgery**, v. 33, n. 1, p. 104–109, 2009.

LINDOSO, J. A. L.; LINDOSO, A. A. B. P. Neglected tropical diseases in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 5, p. 247–253, 2009.

LIU, H.; YANG, G.; TANG, Y.; et al. Physicochemical characterization and pharmacokinetics evaluation of β -caryophyllene/ β -cyclodextrin inclusion complex. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 450, n. 1–2, p. 304–310, 2013.

LOVELYN, C.; ATTAMA, A. A. Current State of Nanoemulsions in Drug Delivery. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 2, n. 5, p. 626–639, 2011.

LU, W.; CHIANG, B.; HUANG, D.; LI, P. Skin permeation of d-limonene-based nanoemulsions as a transdermal carrier prepared by ultrasonic emulsification. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 2, p. 826–832, 2014.

MASON, T. G.; WILKING, J. N.; MELESON, K.; CHANG, C. B.; GRAVES, S. M. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 18, p. R635–R666, 2006.

MCPHERSON, M. L.; CIMINO, N. M. Topical NSAID formulations. **Pain Medicine**, v. 14, p. S35–S39, 2013.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. July, p. 428–435, 2008.

MINODIER, P.; PAROLA, P. Cutaneous leishmaniasis treatment. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 5, n. 3, p. 150–158, 2007.

MO, J.; PANICHAYUPAKARANANT, P.; KAEWNOPPARAT, N.; NITIRUANGJARAS, A.; REANMONGKOL, W. Topical anti-inflammatory and

analgesic activities of standardized pomegranate rind extract in comparison with its marker compound ellagic acid *in vivo*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, n. 3, p. 901–908, 2013.

MORELLI, C. L.; MAHROUS, M.; BELGACEM, M. N.; et al. Natural copaiba oil as antibacterial agent for bio-based active packaging. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 134–141, 2015.

MOU, D.; CHEN, H.; DU, D.; et al. Hydrogel-thickened nanoemulsion system for topical delivery of lipophilic drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 353, n. 1–2, p. 270–276, 2008.

MÜLLER, R. H.; HARDEN, D.; KECK, C. M. Development of industrially feasible concentrated 30% and 40% nanoemulsions for intravenous drug delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 38, n. 4, p. 420–430, 2012.

NETZ, P. A.; ORTEGA, G. G. **Fundamentos de físico-química: uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas**. 1st ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

OLIVEIRA, R. B.; CHAGAS-PAULA, D. A.; SECATTO, A.; et al. Topical anti-inflammatory activity of yacon leaf extracts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 3, p. 497–505, 2013.

PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, v. 69, p. S10–S18, 2014.

PAIVA, L. A. .; RAO, V. S. .; GRAMOSA, N. .; SILVEIRA, E. . Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, n. 1, p. 73–78, 1998.

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366, n. 1–2, p. 170–184, 2009.

PAULA-FREIRE, L. I. G.; ANDERSEN, M. L.; GAMA, V. S.; MOLSKA, G. R.; CARLINI, E. L. A. The oral administration of trans-caryophyllene attenuates acute and chronic pain in mice. **Phytomedicine**, v. 21, n. 3, p. 356–362, 2014.

PEPPAS, N. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 27–46, 2000.

PIERI, F. A.; MUSSI, M. C.; MOREIRA, M. A. S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 465–472, 2009.

PIERI, F. A.; SILVA, V. O.; SOUZA, C. F.; et al. Antimicrobial profile screening of two oils of *Copaifera* genus. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 64, n. 1, p. 241–244, 2012.

PROW, T. W.; GRICE, J. E.; LIN, L. L.; et al. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 470–491, 2011.

PUGLIA, C.; BLASI, P.; RIZZA, L.; et al. Lipid nanoparticles for prolonged topical delivery: An *in vitro* and *in vivo* investigation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 357, n. 1–2, p. 295–304, 2008.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Rang and Dale's Pharmacology**. 6th ed. London: Elsevier, 2007.

RAZA, K.; KUMAR, M.; KUMAR, P.; et al. Topical delivery of aceclofenac: challenges and promises of novel drug delivery systems. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–11, 2014.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.-C.; LOUZIR, H.; et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 9, p. 581–596, 2007.

RHEE, Y. S.; CHOI, J. G.; PARK, E. S.; CHI, S. C. Transdermal delivery of ketoprofen using microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 228, n. 1–2, p. 161–170, 2001.

RYAN, G. B.; MAJNO, G. Acute inflammation: A review. **American Journal of Pathology**, v. 86, n. 1, p. 185–276, 1977.

SAMPATHI, S.; MANKALA, S. K.; WANKAR, J.; DODOALA, S. Nanoemulsion based hydrogels of itraconazole for transdermal drug delivery. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 74, p. 88–92, 2015.

SANDIG, A. G.; CAMPMANY, A. C. C.; CAMPOS, F. F.; VILLENA, M. J. M.; NAVEROS, B. C. Transdermal delivery of imipramine and doxepin from newly oil-in-water nanoemulsions for an analgesic and anti-allodynic activity: Development,

characterization and in vivo evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 103, p. 558–565, 2013.

SANTIAGO, K. B.; CONTI, B. J.; MURBACH TELES ANDRADE, B. F.; et al. Immunomodulatory action of *Copaifera* spp oleoresins on cytokine production by human monocytes. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 70, p. 12–18, 2015.

SANTOS, A. O.; COSTA, M. A.; UEDA-NAKAMURA, T.; et al. *Leishmania amazonensis*: effects of oral treatment with copaiba oil in mice. **Experimental Parasitology**, v. 129, n. 2, p. 145–151, 2011.

SANTOS, A. O.; IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; et al. Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 1, p. 59–64, 2013.

SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS, B. P.; et al. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 204–208, 2008.

SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; et al. Effect of brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 204–208, 2008.

SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; VEIGA JUNIOR, V. F. DA; NAKAMURA, C. V. Copaiba oil: an alternative to development of new drugs against Leishmaniasis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, n. Article ID 898419, p. 1–7, 2012.

SANTOS, R. C. V.; ALVES, C. F. D. S.; SCHNEIDER, T.; et al. Antimicrobial activity of Amazonian oils against *Paenibacillus* species. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 109, n. 3, p. 265–268, 2012.

SARAIVA, R. A.; ARARUNA, M. K. A.; OLIVEIRA, R. C.; et al. Topical anti-inflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 3, p. 504–510, 2011.

SARPIETRO, M. G.; SOTTO, A. DI; ACCOLLA, M. L.; CASTELLI, F. Interaction of β -

caryophyllene and β -caryophyllene oxide with phospholipid bilayers: Differential scanning calorimetry study. **Thermochimica Acta**, v. 600, p. 28–34, 2015.

SAVOIA, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 6, p. 588–596, 2015.

SCHMOOK, F. P.; MEINGASSNER, J. G.; BILLICH, A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in *in-vitro* percutaneous absorption. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 215, n. 1–2, p. 51–56, 2001.

SHAH, P.; BHALODIA, D.; SHELAT, P. Nanoemulsion: a pharmaceutical review. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 1, n. 1, p. 24–32, 2010.

SHAKEEL, F.; RAMADAN, W.; FAISAL, M.; et al. Transdermal and topical delivery of anti-inflammatory agents using nanoemulsion/microemulsion: an updated review. **Current Nanoscience**, v. 6, n. 2, p. 184–198, 2010.

SILVA-JARDIM, I.; THIEMANN, O. H.; ANIBAL, F. F. Leishmaniasis and chagas disease chemotherapy: a critical review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 10, p. 1810–1823, 2014.

SILVA MEDEIROS, R. DA; VIEIRA, G. Sustainability of extraction and production of copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oleoresin in Manaus, AM, Brazil. **Forest Ecology and Management**, v. 256, n. 3, p. 282–288, 2008.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil - A review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239–251, 2004.

SOARES, D. C.; PORTELLA, N. A.; RAMOS, M. F. DE S.; SIANI, A. C.; SARAIVA, E. M. Trans- β -caryophyllene: an effective antileishmanial compound found in commercial copaiba oil (*Copaifera* spp.). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–13, 2013.

SONNEVILLE-AUBRUN, O.; SIMONNET, J.-T.; L'ALLORET, F. Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108–109, p. 145–149, 2004.

SUTRADHAR, K. B.; AMIN, L. Nanoemulsions: increasing possibilities in drug delivery. **European Journal of Nanomedicine**, v. 5, n. 2, p. 97–110, 2013.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108–109, p. 303–318, 2004.

TAPPIN, M. R. R.; PEREIRA, J. F. G.; LIMA, L. A.; et al. Análise química quantitativa para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 236–240, 2004.

THAKUR, A.; WALIA, M. K.; KUMAR, S. L. H. Nanoemulsion in enhancement of bioavailability of poorly soluble drugs: a review. **Pharmacophore**, v. 4, n. 1, p. 15–25, 2013.

UCHINO, T.; LEFEBER, F.; GOORIS, G.; BOUWSTRA, J. Characterization and skin permeation of ketoprofen-loaded vesicular systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, n. 2, p. 156–166, 2014.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. The *Copaifera* L. genus. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 273–286, 2002.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; ROSAS, E. C.; CARVALHO, M. V.; HENRIQUES, M. G. M. O.; PINTO, A. C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne—A comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 2, p. 248–254, 2007.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; ZUNINO, L.; CALIXTO, J. B.; PATITUCCI, M. L.; PINTO, A. C. Phytochemical and antioedematogenic studies of commercial copaiba oils available in Brazil. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 6, p. 476–480, 2001.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; ZUNINO, L.; PATITUCCI, M. L.; PINTO, A. C.; CALIXTO, J. B. The inhibition of paw oedema formation caused by the oil of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, p. 1405–1410, 2006.

VERAS, H. N. H.; ARARUNA, M. K. A.; COSTA, J. G. M.; et al. Topical antiinflammatory activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham: Possible mechanism of

action. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 2, p. 179–185, 2013.

WHO. **Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis**. 2010.

WHO. World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/>>. .

WU, Y.; LI, Y.-H.; GAO, X.-H.; CHEN, H.-D. The application of nanoemulsion in dermatology: an overview. **Journal of Drug Targeting**, v. 21, n. 4, p. 321–327, 2013.

YILMAZ, E.; BORCHERT, H.-H. Effect of lipid-containing, positively charged nanoemulsions on skin hydration, elasticity and erythema—An in vivo study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, n. 2, p. 232–238, 2006.

YU, M.; MA, H.; LEI, M.; LI, N.; TAN, F. *In vitro/in vivo* characterization of nanoemulsion formulation of metronidazole with improved skin targeting and anti-rosacea properties. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, n. 1, p. 92–103, 2014.

CAPÍTULO I

Atividade anti-inflamatória *in vivo* de óleos essenciais - Artigo de revisão a ser submetido à publicação

O texto completo do Capítulo I, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 53 – 92, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta da revisão de pesquisas publicadas sobre a atividade anti-inflamatória *in vivo* de óleos essenciais, bem como a descrição dos modelos mais utilizados em animais para tal estudo.

CAPÍTULO II

Manuscrito publicado no periódico *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*

O texto completo do Capítulo II, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 95 – 109 é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo.

LUCCA, L. G.; DE MATOS, S. P.; BORILLE, B. T.; DIAS, D. DE O.; TEIXEIRA, H. F.; VEIGA-JUNIOR, V. F.; LIMBERGER, R. P.; KOESTER, L. S. Determination of β -caryophyllene skin permeation/retention from crude copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne) and respective oil-based nanoemulsion using a novel HS-GC/MS method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 104, p. 144-148, 2015. DOI: 10.1016/j.jpba.2014.11.013

CAPÍTULO III

Manuscrito publicado no periódico *Journal of Biomedical Nanotechnology*

O texto completo do Capítulo II, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 113 – 134 é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo.

LUCCA, L. G.; DE MATOS, S. P.; DE MATTOS, C. B.; TEIXEIRA, H. F.; LIMBERGER, R. P.; VEIGA JUNIOR, V. F.; DE ARAÚJO, B. V.; KOESTER, L. S. Nanoemulsification Potentiates In Vivo Antiedematogenic Effect of Copaiba Oil. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 13, n. 5, p. 583-590. DOI:10.1166/jbn.2017.2366

CAPÍTULO IV

Manuscrito submetido ao periódico *AAPS PharmSciTech*

O texto completo do Capítulo II, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 137 – 159 é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo.

LUCCA, L. G.; DE MATOS, S. P.; KREUTZ, T.; TEIXEIRA, H. F.; LIMBERGER, R. P.; VEIGA JUNIOR, V. F.; DE ARAÚJO, B. V.; KOESTER, L. S. Anti-inflammatory Effect from a hydrogel containing nanoemulsified copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne) **AAPS PharmSciTech**, [Epub ahead of print]. DOI: 10.1208/s12249-017-0862-6

CAPÍTULO V

Manuscrito a ser submetido ao periódico *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*

O texto completo do Capítulo V, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 163 – 180, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico, sobo título “*Copaiba oil and β -caryophyllene nanoemulsions anti-leishmanial activity*”. Consta do estudo da atividade leishmanicida in vitro do óleo de copaiba, do β -cariofileno e das suas nanoemulsões frente a quatro espécies de *Leishmania* e da atividade in vivo frente à espécie causadora da leishmanio cutânea *Leishmania major*.

DISCUSSÃO GERAL

DISCUSSÃO GERAL

O óleo de copaíba vem sendo estudado nos últimos anos devido ao seu grande interesse pela medicina popular da região amazônica e também por representar uma fonte renovável de um remédio natural neste local (LEANDRO et al., 2012). Popularmente o óleo de copaíba é utilizado como anti-inflamatório (tanto pela via oral quanto tópica), antisséptico e cicatrizante (VEIGA-JUNIOR et al., 2006), mas alguns trabalhos já tem demonstrado seu potencial como antimicrobiano (ALMEIDA VAUCHER, DE et al., 2015; MORELLI et al., 2015), antiparasitário (SILVEIRA et al., 2004; SANTOS et al., 2008, 2011, 2012), larvicida (TRINDADE et al., 2013; RODRIGUES et al., 2014), antineoplásico (GOMES et al., 2008), etc.

Entretanto, o maior interesse no estudo do óleo de copaíba está em seu potencial anti-inflamatório. Alguns estudos já demonstraram que o óleo e até mesmo frações enriquecidas com os sesquiterpenos e diterpenos majoritários do óleo tem a capacidade de diminuir processos inflamatórios causados por diferentes agentes (BASILE et al., 1988; VEIGA-JUNIOR et al., 2001, 2006, 2007; CARVALHO et al., 2005; GOMES et al., 2010).

Nosso grupo de pesquisa vem estudando o desenvolvimento tecnológico de nanoemulsões contendo o óleo de copaíba extraído da espécie *Copaifera multijuga* Hayne que, segundo Veiga-Junior e colaboradores (2007), apresentou melhor atividade anti-inflamatória quando comparada a outras espécies de *Copaifera*. A fim de verificar este potencial pela via tópica, foi desenvolvida e otimizada uma nanoemulsão contendo de óleo de copaíba (DIAS et al., 2014), a qual foi estudada quanto a sua permeação cutânea em comparação com o óleo puro, empregando-se um método validado em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG/EM) (LUCCA et al., 2015).

O método em CG/EM no modo *headspace* permite que as amostras de pele recolhidas no teste de permeação cutânea (fitas do *tape-stripping*, epiderme e derme) sejam colocadas diretamente no *vial* submetido a temperatura e agitação que volatiliza os compostos de interesse. Neste caso, o composto majoritário do óleo de copaíba é o β -cariofileno, tendo

sido validado um método para a sua análise. O método, original, desenvolvido no âmbito desta tese, demonstrou-se linear, preciso, exato e específico.

Além disso, o resultado da permeação cutânea demonstrou que a nanoemulsão contendo o óleo consegue promover a penetração do β -cariofileno até a camada da derme (camada mais profunda), enquanto que, com óleo, o composto não ultrapassa o estrato córneo (camada mais superficial). No entanto, a formulação não conseguiu promover a permeação da substância até o fluido receptor, o qual mimetiza a chegada até a circulação e tecidos mais profundos.

A fim de verificar se modificações na carga de superfície e modificação da viscosidade poderiam facilitar ou aumentar a retenção/permeação de β -cariofileno a partir das nanoemulsões de óleo de copaíba, foi testada a adição de dois tensoativos catiônicos à nanoemulsão previamente otimizada e, após, a sua incorporação em uma forma farmacêutica semissólida.

A incorporação dos tensoativos catiônicos oleilamina (OA) e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) reverteu o potencial zeta da nanoemulsão para uma carga positiva. Entretanto, a concentração de OA que conseguiu reverter foi bastante elevada (acima de 35 mM), enquanto as concentrações de CTAB que reverteram a carga são consideradas baixas e seguras para a utilização em formulações tópicas (ROWE et al., 2009). A OA é uma amina primária que é influenciada pelo pH do meio. Como o pH das nanoemulsões contendo óleo de copaíba apresenta-se ácido (cerca de 3), provavelmente pela presença de ácidos resinosos na interface óleo/água (DIAS et al., 2014), a molécula do tensoativo se apresenta ionizada e isto influencia na reversão do potencial zeta. Como o CTAB é uma amina quaternária, a única explicação para a reversão da carga é a sua saturação na superfície da gotícula (RABINOVICH-GUILATT et al., 2004; MARTINI et al., 2008).

O estudo de permeação/retenção cutânea das formulações contendo OA e CTAB demonstrou que a presença da carga positiva na gotícula da nanoemulsão consegue aumentar a concentração de β -cariofileno na epiderme em cerca de duas vezes a concentração obtida para a nanoemulsão carregada negativamente (NCN), mas não

aumenta sua concentração da derme, como era almejado. Por outro lado, o β -cariofileno foi quantificado no fluido receptor para as nanoemulsões carregadas positivamente (NCP), o que demonstra uma influência também da carga da partícula na permeação através da pele.

É importante ressaltar que o estudo de permeação/retenção cutânea foi realizado até 8 horas, ou seja, as concentrações obtidas mostram um perfil alcançado após esse tempo de exposição da formulação à pele. Esse período foi estabelecido com base no fato de que após 8 horas torna-se difícil manter a integridade da pele e também porque de certa forma mimetiza o tempo de exposição usual a uma formulação tópica. Com base nisso, esse aumento da retenção do β -cariofileno na epiderme deve ser visto como um resultado positivo, visto que esta camada pode representar um “reservatório” para a camada subsequente.

Como as nanoemulsões são sistemas de baixa viscosidade, a incorporação em veículos que promovam o aumento da viscosidade também foi estudado. Foram escolhidos três polímeros para a formação de hidrogéis contendo as nanoemulsões selecionadas, NCN e CNP-CTAB: Carbopol 980®, Natrosol® e quitosana

Os três polímeros apresentam características diferentes, já que o Carbopol® apresenta carga aniônica, o Natrosol® é um polímero não iônico e a quitosana tem carga positiva. A incorporação em gel de quitosana levou a uma instabilidade das nanoemulsões, aumentando seu tamanho de gotícula e seu índice de polidispersão, apesar de continuar apresentando um potencial zeta elevado. Tanto os hidrogéis de Carbopol® quanto de Natrosol® mostraram-se eficientes na incorporação nas nanoemulsões, porém somente o gel de Natrosol®, devido ao seu caráter neutro foi selecionado para dar continuidade aos estudos de permeação cutânea e atividade anti-inflamatória *in vivo*.

Quanto a permeação das nanoemulsões incorporadas em hidrogel, pode-se verificar que houve um aumento na retenção de β -cariofileno na derme em relação ao encontrado para as nanoemulsões, e que houve a facilitação de permeação até o fluido receptor. Porém, não há diferença estatística entre as duas formulações, indicando que a carga não influencia na penetração na pele e sim outros fatores, como oclusão, viscosidade e hidratação do local devido à quantidade de água presente na formulação (AL-SUBAIE et al., 2015). Todos os

resultados do estudo de permeação cutânea (formulações nanoemulsionadas e semissólidas) estão dispostos na Tabela 1 para fins de comparação.

Tabela 1. Resultados do estudo de permeação cutânea para as formulações desenvolvidas nesta tese e o óleo de copaíba.

	OC	NCN	NCP	NCN-HEC	NCP-HEC
Etrato córneo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	$0,57 \pm 0,26$	$0,07 \pm 0,05$	$0,05 \pm 0,03$	$0,18 \pm 0,17$	$0,09 \pm 0,07$
Epiderme ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	ND	$3,53 \pm 0,97$	$6,63 \pm 2,74$	$7,91 \pm 2,46$	$9,76 \pm 2,65$
Derme ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	ND	$1,06 \pm 0,39$	$1,45 \pm 0,83$	$1,95 \pm 0,56$	$2,43 \pm 0,91$
Fluido receptor ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	ND	ND	$0,32 \pm 0,32$	$1,80 \pm 0,85$	$0,67 \pm 0,22$

OC: óleo de copaíba; NCN: nanoemulsão carregada negativamente; NCP: nanoemulsão carregada positivamente; NCN-HEC: nanoemulsão carregada negativamente incorporada em hidrogel de hidroxietilcelulose; NCP-HEC: nanoemulsão carregada positivamente incorporada em hidrogel de hidroxietilcelulose; ND: não detectado.

Finalmente, o estudo da atividade *in vivo* das formulações selecionadas demonstrou que o óleo de copaíba apresenta atividade anti-inflamatória e que a sua incorporação em nanoemulsões aumenta este efeito, já que estas apresentaram maior percentagem de inibição de edema tanto no modelo de edema de pata de rato quanto no modelo de edema de orelha de camundongo. O estudo desenvolvido neste trabalho foi o primeiro da literatura a demonstrar a potencialização da atividade anti-inflamatória do óleo de copaiba a partir de sua nanoemulsificação, com ou sem espessamento em hidrogel, bem como a correlação

dessa atividade com os resultados da retenção/permeação do β -cariofileno nas camadas da pele.

No entanto, ambas nanoemulsões, tanto negativa quanto positivamente carregadas, apresentaram resultado semelhante para a inibição do edema. Quando compara-se a permeação cutânea das formulações verifica-se que na derme não há diferença estatística, o que pode justificar a semelhança na inibição da inflamação no teste *in vivo*. Uma hipótese para explicar tal efeito seria a saturação da camada da derme, que pode apresentar um limite na concentração de substâncias que permeiam até ela.

Em relação à atividade das formulações incorporadas em hidrogel, pode-se verificar que a incorporação das nanoemulsões de óleo de copaíba em hidrogel também favoreceu o efeito anti-inflamatório tópico do óleo no modelo de edema de pata, especialmente para a formulação carregada positivamente. Quando ao resultado do modelo de edema de orelha, as formulações tiveram um perfil equivalente ao controle cetoprofeno, porém não modificaram o efeito do óleo, que também apresentou valores altos de inibição de edema.

Como descrito anteriormente, o óleo de copaíba, bem como seu componente majoritário, β -cariofileno, já foram descritos na literatura como leishmanicidas frente à espécie *Leishmania amazonenses*, causadora da forma cutânea da doença (SANTOS et al., 2008, 2011, 2012). Ainda, Gupta e colaboradores (GUPTA et al., 2015) descrevem que este óleo fornece um efeito sinérgico ao efeito da anfotericina B frente à *Leishmania donovani*, quando incorporados em uma nanoemulsão. Neste trabalho, foi descrito, de forma inovadora, a avaliação das nanoemulsões contendo o óleo de copaíba de uma espécie determinada (*Copaifera multijuga*) e de β -cariofileno no tratamento de quatro espécies de *Leishmania* (*L. amasonensis*, *L. braziliensis*, *L. donovani* e *L. major*).

Frente às formas amastigotas intracelulares, tanto o óleo e β -cariofileno quanto as suas formulações foram efetivas para as espécies *L. donovani* e *L. major*. Contra as espécies *L. amasonensis* e *L. braziliensis* apenas β -cariofileno puro e as nanoemulsões foram efetivos, apresentando baixos valores de IC₅₀ (concentração inibitória de 50% da população). Além disso, todos os tratamentos apresentaram baixa citotoxicidade frente a células de macrófagos não infectados.

No teste *in vivo* com camundongos infectados com *Leishmania major* observou-se que todos os tratamentos (óleo de copaíba, β -cariofileno e nanoemulsões) foram capazes de reduzir a área da lesão, em comparação com o controle não tratado. Estes resultados corroboram com testes *in vitro*, nos quais todos os tratamentos apresentaram valores de CI₅₀ pequenos. Porém nenhum animal apresentou recuperação total da doença, o que pode estar relacionado com a dificuldade dos tratamentos acessarem o local da infecção devido à formação de uma crosta muito espessa. Além disso, são necessários outros testes para verificar a quantidade de parasitos no local da infecção e confirmar a redução da carga parasitária.

REFERÊNCIAS

- AL-SUBAIE, M. M.; HOSNY, K. M.; EL-SAY, K. M.; AHMED, T. A.; ALJAEID, B. M. Utilization of nanotechnology to enhance percutaneous absorption of acyclovir in the treatment of *Herpes simplex* viral infections. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 3973–3985, 2015.
- ALMEIDA VAUCHER, R. DE; GIONGO, J. L.; BOLZAN, L. P.; et al. Antimicrobial activity of nanostructured Amazonian oils against *Paenibacillus* species and their toxicity on larvae and adult worker bees. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 18, n. 2, p. 205–210, 2015.
- BASILE, A. C.; SERTIÉ, J. A. A.; FREITAS, P. C. D.; ZANINI, A. C. Anti-inflammatory activity of oleoresin from brazilian copaifera. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, p. 101–109, 1988.
- CARVALHO, J. C. T.; CASCON, V.; POSSEBON, L. S.; et al. Topical antiinflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* dwyer. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 11, p. 946–950, 2005.
- DIAS, D. O.; COLOMBO, M.; KELMANN, R. G.; et al. Optimization of copaiba oil-based nanoemulsions obtained by different preparation methods. **Industrial Crops and**

Products, v. 59, p. 154–162, 2014.

GOMES, N. D. M.; REZENDE, C. D. M.; FONTES, S. P.; et al. Antineoplastic activity of *Copaifera multijuga* oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich tumor. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 1, p. 179–184, 2008.

GOMES, N. D. M.; REZENDE, C. M. DE; FONTES, S. P.; et al. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of fractions obtained from *Copaifera multijuga* Hayne. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 1, p. 177–183, 2010.

GUPTA, P. K.; JAISWAL, A. K.; ASTHANA, S.; et al. Synergistic enhancement of parasitocidal activity of amphotericin B using copaiba oil in nanoemulsified carrier for oral delivery: an approach for non-toxic chemotherapy. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 14, p. 3596–3610, 2015.

LEANDRO, L. M.; VARGAS, F. DE S.; BARBOSA, P. C. S.; et al. Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 3866–3889, 2012.

LUCCA, L. G.; MATOS, S. P. DE; BORILLE, B. T.; et al. Determination of β -caryophyllene skin permeation/retention from crude copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne) and respective oil-based nanoemulsion using a novel HS-GC/MS method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 104, p. 144–148, 2015.

MARTINI, É.; FATTAL, E.; OLIVEIRA, M. C. DE; TEIXEIRA, H. Effect of cationic lipid composition on properties of oligonucleotide/emulsion complexes: Physico-chemical and release studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, n. 1–2, p. 280–286, 2008.

MORELLI, C. L.; MAHROUS, M.; BELGACEM, M. N.; et al. Natural copaiba oil as antibacterial agent for bio-based active packaging. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 134–141, 2015.

RABINOVICH-GUILATT, L.; COUVREUR, P.; LAMBERT, G.; et al. Extensive surface studies help to analyse zeta potential data: the case of cationic emulsions. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 131, n. 1, p. 1–13, 2004.

RODRIGUES, E. DA C. R.; FERREIRA, A. M.; VILHENA, J. C. E.; et al. Development

of a larvicidal nanoemulsion with Copaiba (*Copaifera duckei*) oleoresin. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 6, p. 699–705, 2014.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. (EDS.). **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6th ed. London: Pharmaceutical Press, 2009.

SANTOS, A. O.; COSTA, M. A.; UEDA-NAKAMURA, T.; et al. *Leishmania amazonensis*: effects of oral treatment with copaiba oil in mice. **Experimental Parasitology**, v. 129, n. 2, p. 145–151, 2011.

SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; et al. Effect of brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 204–208, 2008.

SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; VEIGA JUNIOR, V. F. DA; NAKAMURA, C. V. Copaiba oil: an alternative to development of new drugs against Leishmaniasis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, n. Article ID 898419, p. 1–7, 2012.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil - A review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239–251, 2004.

TRINDADE, F. T. T.; STABELI, R. G.; PEREIRA, A. A.; FACUNDO, V. A.; SILVA, A. D. A. *Copaifera multijuga* ethanolic extracts, oil-resin, and its derivatives display larvicidal activity against *Anopheles darlingi* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 3, p. 464–470, 2013.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; ROSAS, E. C.; CARVALHO, M. V.; HENRIQUES, M. G. M. O.; PINTO, A. C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne—A comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 2, p. 248–254, 2007.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; ZUNINO, L.; CALIXTO, J. B.; PATITUCCI, M. L.; PINTO, A. C. Phytochemical and antioedematogenic studies of commercial copaiba oils available in

Brazil. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 6, p. 476–480, 2001.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; ZUNINO, L.; PATITUCCI, M. L.; PINTO, A. C.; CALIXTO, J. B. The inhibition of paw oedema formation caused by the oil of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, p. 1405–1410, 2006.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Através do estudo realizado pode-se concluir que:

- O método bioanalítico validado em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas no modo *headspace* mostrou-se linear, exato, preciso e específico para a quantificação de β -cariofileno em amostras de pele submetidas ao teste de permeação cutânea de nanoemulsões de óleo de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne);
- A permeação cutânea comparando o óleo de copaíba puro e as nanoemulsões contendo o óleo demonstrou que o β -cariofileno fica retido no estrato córneo quando aplicou-se o óleo puro, enquanto que, a partir da nanoemulsão, ele atinge a derme;
- O estudo de formulação de nanoemulsões de óleo de copaíba com carga de superfície positiva através da incorporação de tensoativos catiônicos a uma formulação previamente otimizada demonstrou que:
 - (i) a adição de oleilamina somente mudou o potencial zeta da formulação quando em altas concentrações;
 - (ii) o tensoativo brometo de cetiltrimetilamônio conseguiu inverter a carga de superfície das nanoemulsões em concentrações aceitáveis para o uso tópico;
 - (iii) a retenção cutânea do β -cariofileno a partir das formulações positivamente carregadas aumentou em três vezes na camada da epiderme (em relação a nanoemulsão aniônica), mas na derme não houve mudança estatisticamente significativa;
- A incorporação das nanoemulsões (negativa e positivamente carregadas) em três tipos de hidrogéis revelou que:

- (i) os polímeros iônicos (carbômero e quitosana) promovem a inversão do potencial zeta de nanoemulsões com carga de superfície contrária à do polímero;
- (ii) o valor do potencial zeta aumenta com a incorporação em hidrogéis, levando a crer que os polímeros podem adsorver na superfície da nanoemulsão;
- (iii) a incorporação em quitosana aumenta a instabilidade das formulações, aumentando o tamanho de gotícula e índice de polidispersão;

- A permeação cutânea e a retenção epidérmica do β -cariofileno a partir das nanoemulsões catiônica e aniônica incorporadas em hidrogel de hidroxietilcelulose foi aumentada em 2 e 1,5 vezes, respectivamente, em relação às nanoemulsão original, mas não ocasionou alteração na derme;
- O estudo da atividade *in vivo* das formulações revelou que a nanoemulsificação do óleo de copaíba leva a um aumento no efeito anti-inflamatório tópico, o que corrobora a hipótese de que as nanoemulsões facilitam a penetração dos componentes do óleo na pele;
- A incorporação das nanoemulsões de óleo de copaíba em hidrogel também favoreceu o efeito anti-inflamatório tópico do óleo no modelo de edema de pata, especialmente para a formulação carregada positivamente. Quanto ao resultado do modelo de edema de orelha, as formulações tiveram um perfil equivalente ao controle cetoprofeno, porém não modificaram o efeito do óleo;
- Quanto à atividade do óleo de copaíba, β -cariofileno e das formulações nanoemulsionadas frente ao parasito causador da Leishmaniose pode-se concluir que:
 - (i) Os testes *in vitro* mostraram que os tratamentos foram mais eficazes nas espécies de *Leishmania* do “Velho Mundo” (*L. major* e *L. donovani*) em comparação com as do “Novo Mundo” (*L. amazonensis* e *L. braziliensis*);

- (ii) Contra as formas amastigotas intracelulares, o β -cariofileno e a nanoemulsão carregada com β -cariofileno foram os tratamentos mais ativos, com baixos valores de IC_{50} (abaixo de 4 $\mu\text{g/mL}$);
- (iii) O teste *in vivo* mostrou que todos os tratamentos foram capazes de reduzir a área da ferida dos camundongos infectados com *L. major*. No entanto, eles não conseguiram recuperar totalmente os animais.

Os anexos contidos nas páginas 201 à 224 correspondem aos artigos publicados desta tese e foram retirados devido aos direitos autorais fornecido aos respectivos periódicos onde estes foram publicados.

